

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2019

Bc. Iveta Kotzurová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

**EKOTOXIKOLOGICKÉ POSOUZENÍ BIOUHLU Z
ČISTÍRENSKÉHO KALU**

ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF BIOCHAR FROM SEWAGE SLUDGE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Iveta Kotzurová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1327/2018
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studentka: **Bc. Iveta Kotzurová**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Vedoucí práce: **doc. MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Ekotoxikologické posouzení biouhlu z čistírenského kalu

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše týkající se problematiky biouhlu.
2. Výběr vhodné baterie testů ekotoxicity a volba environmentálně relevantního způsobu testování biouhlu.
3. Na podkladě vyhodnocení endpointů vybraných testů posoudit ekotoxikologický dopad "využití" biouhlu v půdním ekosystému.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Iveta Kotzurová
student(ka)

doc. MVDr. Helena Zlámalová
Gargošová, Ph.D.
vedoucí práce

doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Náplní této diplomové práce je posouzení ekotoxikologického účinku biouhlu vyrobeného z čistírenských kalů. V případě aplikace biouhlu na zemědělskou půdu může docházet k ovlivnění půdního i vodního ekosystému, proto byly pro posouzení ekotoxikologického účinku zvoleny testy v kontaktním i akvatickém uspořádání. Zástupcem půdních bezobratlých byla žížala hnojní *Eisenia fetida*, z vodních živočichů byli vybráni korýši *Daphnia magna* a *Artemia salina* a terestrické rostliny byly reprezentovány salátem setým *Lactuca sativa*, hořčicí bílou *Sinapis alba* a cibulí kuchyňskou *Allium cepa*. Výsledky kontaktních testů poukazují především na to, jak by mohl být ekosystém negativně ovlivněn dávkou vnášeného biouhlu. V testech v akvatickém uspořádání, kde byla sledována ekotoxicita vodných výluhů, výsledky poukázaly na rozdíl v citlivosti jednotlivých organismů. Jako nejvíce zátěžový se u všech organismů projevil sušený čistírenský kal, následně bylo prokázáno snížení jeho ekotoxicity po termické úpravě. Nejlepší výsledky a tedy nejnižší negativní vliv na testovací organismy vykazoval peletizovaný biouhel s přísadkou aditiva.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis is to assess the ecotoxicological effect of biochar produced from sewage sludge. In case of application of biochar to agricultural land, both the soil and aquatic ecosystem may be affected therefore contact and aquatic tests were chosen to assess the ecotoxicological effects. Representatives of soil invertebrates were earthworms *Eisenia fetida*; *Daphnia magna* and *Artemia salina* were chosen from aquatic animals and terrestrial plants were represented by *Lactuca sativa*, *Sinapis alba* and *Allium cepa*. The results of contact tests point out how ecosystem could be negatively affected by biochar dose. Through aqueous extract were shown differences in sensitivity of individual organisms in aquatic tests. Dried sewage sludge was found to be the biggest burden for all tested organisms. The pelletized biochar with the addition of an additive showed the lowest negative effect on tested organisms.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ekotoxicita, biouhel, čistírenský kal, testování ekotoxicity.

KEYWORDS

Ecotoxicity, biochar, sewage sludge, ecotoxicity testing.

KOTZUROVÁ, Iveta. *Ekotoxikologické posouzení biouhlu z čistírenského kalu*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115984>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Helena Zlámalová Gargošová.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Touto cestou bych chtěla poděkovat především paní doc. MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph. D. za její odborné vedení, nekonečnou trpělivost, veškeré připomínky a cenné rady při sepisování této práce. Výzkumnému centru AdMaS v Brně děkuji za poskytnutí vzorků. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za povzbuzující podporu během celého mého studia.

OBSAH

1 ÚVOD.....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Nakládání s čistírenskými kaly	8
2.1.1 Přehled současné legislativy	9
2.1.2 Sušení čistírenského kalu.....	10
2.2 Biouhel	10
2.2.1 Vlastnosti biouhlu vyrobeného z čistírenského kalu.....	11
2.2.2 Využití biouhlu v zemědělství	12
2.2.3 Aplikace biouhlu na zemědělskou půdu	12
2.3 Produkce biouhlu	14
2.3.1 Mikrovlnná pyrolýza	14
2.4 Vybrané metody pro posouzení ekotoxicity	15
2.4.1 Testy v kontaktním uspořádání	15
2.4.2 Testy v akvatickém uspořádání	16
2.5 Ekotoxicita biouhlu	16
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	18
3.1 Testovaný materiál	18
3.2 Testy v kontaktním uspořádání	19
3.2.1 Půdní matrice a stanovení jejich vlastností	20
3.2.2 Test únikového chování se žížalami dle normy ISO 17512-1	22
3.2.3 Test reprodukce žížal dle ČSN ISO 11268-2	23
3.2.4 Test stanovení inhibice růstu kořene salátu dle ČSN EN ISO 11269-1	25
3.3 Testy v akvatickém uspořádání	26
3.3.1 Příprava vodných výluhů	26
3.3.1 Test akutní toxicity na perloočkách <i>D. magna</i>	27
3.3.2 Test akutní toxicity na žábronožkách <i>A. salina</i>	28
3.3.3 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>S. alba</i>	30
3.3.4 Test inhibice růstu kořenů cibule <i>A. cepa</i>	31
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	32
4.1 Testy v kontaktním uspořádání	32
4.1.1 Stanovení vlastností testovaných matric	32
4.1.1 Test únikového chování se žížalami <i>E. fetida</i>	33
4.1.1 Test reprodukce se žížalami <i>E. fetida</i>	35
4.1.2 Test stanovení inhibice růstu kořene salátu setého <i>L. sativa</i>	38

4.2	Testy v akvatickém uspořádání	41
4.2.1	Vodné výluhy	41
4.2.2	Test akutní toxicity na perloočkách <i>D. magna</i>	41
4.2.1	Test akutní toxicity na žábřonožkách <i>A. salina</i>	44
4.2.1	Test inhibice růstu kořene hořčice bílé <i>S. alba</i>	46
4.2.1	Test inhibice růstu kořene cibule <i>A. cepa</i>	49
4.3	Souhrnná diskuze výsledků	50
5	ZÁVĚR.....	53
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	54

1 ÚVOD

Problematika likvidace čistírenských kalů je velmi diskutovaným tématem několika posledních let. Splaškový kal je odpad, který je obtížné recyklovat a jeho použití v zemědělství je často kritizováno z řad odborníků. Je sice zdrojem cenných živin, ale také se v něm koncentrují látky jako těžké kovy, léčiva, perzistentní organické látky a mnoho dalších. Tyto látky významně znečišťují životní prostředí, a proto se od přímého využití čistírenských kalů v zemědělství začíná pomalu upouštět. Po aplikaci čistírenského kalu na půdu existuje vysoké riziko, že by kontaminanty mohly být přijímány organismy a rostlinami nebo vyluhovány do povrchových a podzemních vod.

Jednou z možností, jak využít čistírenský kal jako odpadní surovinu a snížit obsah kontaminantů, nebo zabezpečit jejich stabilizaci je jeho pyrolýza. Pyrolýzou biomasy vzniká jako jeden z produktů právě biouhel. Pro své vlastnosti se biouhel jeví jako látka velmi užitečná pro aplikaci v zemědělství. Výroba biouhlu z čistírenských kalů proto může být slibným řešením pro nakládání s čistírenskými kaly a zlepšování půdních vlastností, včetně sekvestrace uhlíku. Právě ukládání sloučenin uhlíku mimo atmosféru Země by mohlo mít vliv na zmírnění problémů s klimatem.

Biouhel se vyrábí především z odpadní biomasy, což podporuje recyklaci a opětovné použití odpadu a to je jeden z hlavních cílů uplatnění cirkulární ekonomiky, ke kterým je třeba v dnešní době směřovat.

Na čistírenský kal je třeba pohlížet jako na poměrně nehomogenní materiál, proto vlastnosti a složení produktů pyrolýzy budou vždy závislé na kvalitě vstupní suroviny. To je také důvodem, proč není možné vlastnosti tohoto typu biouhlu jednoduše generalizovat.

Cílem této práce je posouzení ekotoxikologických vlastností biouhlu vyrobeného z čistírenského kalu pomocí vhodné baterie testů. Ta byla zvolena na základě předpokladu aplikace tohoto typu biouhlu na zemědělskou půdu, ale také pro posouzení biouhlu jako odpadu, kam z legislativního hlediska spadá. Byly tedy využity jak testy kontaktní, kde byl sledován přímý vliv biouhlu na testovací organismy, tak testy v akvatickém uspořádání pro které byly připraveny vodné výluhy testovaných vzorků. Celkem byly testovány čtyři vzorky biouhlu a pro srovnání vzorek sušeného čistírenského kalu, který byl surovinou pro výrobu jednoho z nich.

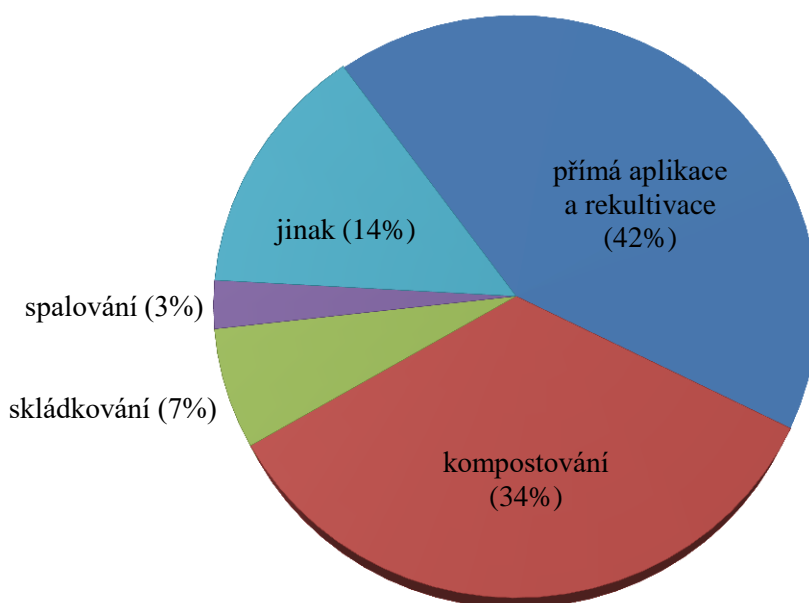
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nakládání s čistírenskými kaly

Čistírenský kal je produkt, který vzniká při procesu čištění komunálních nebo průmyslových odpadních vod. Dochází k separaci znečišťujících látek od odpadní vody za použití fyzikálních, chemických, fyzikálně-chemických a biologických procesů. Některé látky mohou být jednoduše odbourány, jiné se v kalu koncentrují. Jsou to zejména těžké kovy, špatně rozložitelné organické sloučeniny a potenciálně patogenní organismy, např. *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, termotolerantní koliformní bakterie, enterokoky (1). Kromě toho jsou kaly produkty bohaté na nutrienty (N, P, K) a cennou organickou hmotu, proto se po prvotní úpravě využívají především v zemědělství, přičemž dochází k recyklaci těchto cenných složek.

Množství vzniklého čistírenského kalu odpovídá zhruba 1 – 2 % objemu čištěných vod a ročně ho vzniká v rámci ČR až 180 000 tun (2). Z legislativního hlediska je na kaly z ČOV dle ustanovení § 25 odst. 1 zákona č. 185/2001 Sb., o odpadech v platném znění (dále jen „zákon o odpadech“) nahlíženo jako na tzv. vybrané odpady. Povinností každého původce odpadů kalů z ČOV a oprávněných osob (osoby nakládající s kaly) je poskytovat správním úřadům na úseku odpadového hospodářství veškeré a pravdivé informace o odpadech a provozu zařízení (3).

Český statistický úřad (ČSÚ) ve své výroční zprávě z roku 2017 uvádí způsoby zneškodňování čistírenského kalu a četnost jejich využití, viz Obrázek 1 (2).



Obrázek 1 – Způsoby zneškodňování kalů z ČOV a jejich četnost pro rok 2017 (2)

2.1.1 Přehled současné legislativy

Nejvíce využívaným způsobem likvidace čistírenských kalů v roce 2017 byly jeho přímé aplikace na zemědělskou půdu a jeho využití v rámci rekultivace. Od 1. 1. 2017 platí vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 437/2016 Sb., o použití čistírenských kalů na zemědělské půdě. Tato vyhláška zpřísňuje nejen podmínky úpravy kalů před použitím, ale i podmínky skladování a aplikace upravených kalů. Zejména jsou zpřísněna mikrobiologická kritéria pro použití upravených kalů na zemědělskou půdu, konkrétně limitní hodnoty indikátorových mikroorganismů až o tři řády. Navíc od 1. 1. 2020 bude povoleno aplikovat na zemědělskou půdu pouze kal kategorie I (dle tabulky č. 1 přílohy č. 4 a 7 diskutované vyhlášky). Další změnou je povinnost sledovat obsah dvanácti vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU). Vyhláška povoluje k aplikaci na zemědělskou půdu množství 5 tun sušeného čistírenského kalu na 1 hektar (dále $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$) a při splnění daných limitů až $10 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Musí být zcela prokazatelné, že technologie úpravy kalu (např. anaerobní vyhnívání, hygienizace vápnem, sušení) je dostatečně účinná kaly efektivně hygienizovat – zničit nebo snížit množství patogenních organismů na požadovanou úroveň (4). I po účinné hygienizaci jsou však v kalech stále obsaženy látky znečišťující životní prostředí (těžké kovy, zbytky léčiv, pracích a kosmetických prostředků), proto lze v budoucnu předpokládat úplný zákaz používání čistírenských kalů na zemědělské půdě (5).

Kompostování, jako způsob likvidace čistírenských kalů, bylo dříve hojně využíváno, avšak dne 3. 9. 2017 vzešla v platnost vyhláška č. 237/2017 Sb., kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva. Dochází v ní ke zpřísnění mikrobiologických požadavků na organická hnojiva a substráty, při jejichž výrobě byly použity odpady z čistíren odpadních vod a to v souladu s vyhláškou č. 437/2016 Sb., o použití čistírenských kalů na zemědělské půdě. Rozdílem je absence přechodného období do roku 2020 a tedy okamžitá platnost této vyhlášky. Očekávána je ztráta zájmu kompostáren odebírat čistírenský kal a to proto, aby se zbavili povinnosti mikrobiologických analýz. Ne každý výrobce kompostu totiž dosahuje při kompostování teploty $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nemuselo by dojít ke zničení případných patogenů a choroboplodných zárodků (6).

Skládkování kalů je podle vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu zakázáno, přesto je určitá část na skládky stále ukládána (2). Obecně se od skládkování postupně upouští. Evropská unie se zavázala, že její členské státy do roku 2025 přestanou skládkovat recyklovatelné materiály a do roku 2030 dokonce jakýkoliv odpad (7).

Mění se legislativa a stále vyšší nároky na ochranu životního prostředí budou mít v následujících letech zásadní vliv na způsob nakládání s čistírenskými kaly. Řada ČOV již

nyní stojí před rozhodnutím, jakým směrem se vydat při úpravě nebo výměně kalových koncovek, které již nebudou vyhovovat platné legislativě.

Jedním z možných trvale udržitelných řešení by mohla být stabilizace sušením, která zajistí úplnou hygienizaci, značně redukuje hmotnost kalu a usnadní manipulaci. Následné energetické využití či materiálovou transformaci sušeného kalu lze zajistit technologiemi, jako jsou spalování, pyrolýza, torefakce nebo zplyňování (8).

2.1.2 Sušení čistírenského kalu

Jak již bylo zmíněno, sušení čistírenského kalu bude v budoucnu pravděpodobně hojně využívanou technologií. Během sušení dochází ke snížení hmotnosti na čtvrtinu a objemu až na polovinu původního. Obsah sušiny výsledného produktu se pohybuje kolem 90 %, což je žádoucí pro následné materiálové transformace, hlavně z hlediska energetické udržitelnosti. Po vysušení je kal také zcela hygienizován a bývá splněna podmínka pro bezpečnou manipulaci, skladování či případné použití na zemědělskou půdu (8) (9).

Technologické zařízení na sušení čistírenských kalů – sušárny, se od sebe mohou lišit způsobem dodávání energie potřebné k procesu a transportem materiálu v sušárně. Rozlišujeme kontaktní (kondukční), konvekční a solární sušárny (10). Rozdíl mezi kontaktním a konvekčním způsobem je ten, že při kontaktním uspořádání je tepelná energie přenášena vnitřním povrchem strojního zařízení, zatímco konvekční způsob je založen na přímém kontaktu plynného média a čistírenského kalu (8). Solární sušárny využívají kombinace možných způsobů přestupu tepla, tedy přestup zářením, konvekční i kontaktní. Přestože jsou náročné na využitý prostor, jejich hlavní výhodou je využívání solární energie, která patří mezi obnovitelné zdroje (10).

Nejčastěji používané jsou sušárny fluidní a pásové, které využívají k sušení horký vzduch. Fluidní sušárna pracuje při teplotě 85 °C v podtlaku, přičemž je zabráněno úniku škodlivin z cirkulačního plynu a samovznícení. (10). Nízkoteplotní pásová sušárna se skládá z pásů umístěných nad sebou, kde vzniká velká kontaktní plocha, přes kterou je pomocí ventilátorů proháněn horký vzduch. Pomocí peletizátoru je na pás pokládána homogenní propustná vrstva kalu tvořená kalovými nudlemi, které se rozbíjí na menší kusy následným přepadem na nižší pás. Tvar sušeného kalu, respektive jeho granulometrické vlastnosti, se liší dle použité technologie (8) (11).

2.2 Biouhel

Biouhel (z angl. Biochar) je produkt bohatý na uhlík, vzniklý zahříváním biomasy v uzavřeném prostoru za minimálního nebo žádného přístupu vzduchu (12). Jedná se o stabilní materiál s vysokou porozitou a širokými možnostmi využití. Vyrábí se tepelným rozkladem organického materiálu (např. kaly z ČOV, dřevní štěrka, zvířecí trus), nejčastěji

pyrolýzou či karbonizací (13). Jeho původ je často spojován s dávnými obyvateli Jižní Ameriky v oblasti Amazonie, kteří podle historických pramenů spalovali zbytky dřeva při nízkých teplotách za vzniku dřevěného uhlí, mísili jej s organickými zbytky, jako jsou kosti, vnitřnosti, či exkrementy a společně vpravovali do půdy. Tímto procesem opakovaným po generace měly vzniknout vysoce úrodné černozemě známé jako Terra Préta de Índio (14).

2.2.1 Vlastnosti biouhlu vyrobeného z čistírenského kalu

To, jaké bude mít biouhel vlastnosti a chemické složení, je vždy ovlivněno podmínkami pyrolýzy a charakterem výchozí suroviny (15). V případě čistírenského kalu hraje roli jeho původ, technologie použita při čištění odpadních vod, velikost čistírny i přítomnost a druh průmyslu a zemědělské činnosti v dané lokalitě.

Hlavní stavební složkou biouhlu je chemicky stabilní uhlík a to v množství přibližně 20 – 30 %. Nepodléhá dalšímu rozkladu ani oxidaci, což má velkou výhodu v tzv. sekvestraci uhlíku, tedy dlouhodobému a bezpečnému skladování uhlíku v životním prostředí a omezením tvorby skleníkových plynů (16).

Chemické a fyzikální vlastnosti biouhlu významně ovlivňuje především teplota pyrolýzy, která je jedním z nejdůležitějších parametrů procesu (17). Vyšší teploty pyrolýzy mají obecně za následek snížení výtěžku produktu a to v důsledku těkavosti některých organických frakcí. Podle řady studií biouhel vyrobený při nižších teplotách bývá kyselé až neutrální, zatímco biouhel vyrobený při vysoké teplotě kolem 700 °C může mít naopak charakter zásaditý s pH v rozmezí 12 – 13 (18) (19). Takovéto zvýšení může být způsobeno polymerizačními či kondenzačními reakcemi alifatických sloučenin, rozkladem kyselých povrchových skupin během tepelného zpracování a koncentrací anorganických složek v biouhlu vznikajících separací solí kovů z organické matrice při zvýšených teplotách (20). Výsledky studie (19) dokazují, že koncentrace N i P ve formě dostupné pro příjem rostlinou jsou velmi nízké a závisí na teplotě procesu. Při zvýšení teploty pyrolýzy z 300 °C na 700 °C se celkový obsah dusíku snížil o 55 %. Je tomu tak důsledkem volatilizace a ztráty frakcí $\text{NH}_4\text{-N}$ a $\text{NO}_3\text{-N}$ jako těkavých látek obsahujících dusíkaté skupiny. U fosforu měla zvyšující se teplota pozitivní vliv na jeho množství, které se zvyšovalo. To dokazuje, že fosfor je spojen s anorganickou frakcí kalu (19). Také koncentrace všech mikronutrientů (K, Ca, Fe, Mg, S) jako celkových prvků měla rostoucí charakter se zvyšující se teplotou pyrolýzy (19).

Během pyrolýzy se do biocharu koncentrují také těžké kovy, jako např. Zn, Cd, Pb, Cu, As, Cr, Hg. S rostoucí teplotou pyrolýzy se jejich celková koncentrace zvyšuje, ale zároveň se zvyšuje jejich stabilita, což snižuje jejich vyluhovací potenciál (17). Podle studie Račka a kol. (21), kteří sledovali fixaci vybraných těžkých kovů na biochar, byla mikrovlnou pyrolýzou snížena biologická dostupnost těžkých kovů v průměru o 74 % (21).

Na základě toho, že většina studií zabývajících se vlastnostmi biouhlu vyrobeného z čistírenského kalu byla provedena za trochu odlišných podmínek a také vzhledem k jejich nízkému počtu a faktu, jak nehomogenní materiál čistírenský kal je, je nutno tento výčet vlastností nezobecňovat, ale spíše by měly sloužit jako vodítko při dalším bádání.

2.2.2 Využití biouhlu v zemědělství

Hlavní tendence využití biouhlu vyrobeného z čistírenského kalu směřuje k jeho aplikaci na zemědělskou půdu. Vzhledem k nebezpečným vlastnostem samotného čistírenského kalu a rizikem spojeným s aplikací na zemědělskou půdu je právě termická přeměna na biouhel jednou z diskutovaných možností řešení problematiky nakládání s čistírenským kalem.

Biouhel vyrobený z odpadních kalů je specifický v tom, že obsahuje širokou škálu prvků důležitých pro pěstování plodin jako je N, P, K, Ca a mikronutrienty, které by se měly postupně do půdy uvolňovat. To znamená, že biochar nemusí přispět významným množstvím živin okamžitě po aplikaci, ale pravděpodobně až v dlouhodobém horizontu (19). V některých případech je biochar mylně považován za úplnou náhradu hnojiv. Přítomnost biouhlu zvyšuje kationtově výměnnou kapacitu půdy (KVK) až o 40 %, což přispívá k zadržování kationtů potřebných pro výživu rostlin. Dochází také k zamezení vyluhovatelnosti nutrientů a následného průniku do podzemních vod, čímž by mohl být zvýšen stupeň využití použitých hnojiv (16) (18). Aplikace biocharu by mohla pomoci i při neutralizaci půd. Použití biouhlu vyrobeného při vyšších teplotách, tedy s vyšší hodnotou pH, by mohlo být dosaženo neutralizace příliš kyselých půd a naopak pro alkalické zeminy mohou být vhodné biouhly vyrobené při nižších teplotách, aby se odstranily problémy s alkalitou (18).

Oproti čistírenským kalům, které jsou prakticky neporézní, se díky pyrolýze získá materiál s více vyvinutou povrchovou strukturou. Přítomností biouhlu by se měla zvýšit kapacita zadržování vody v půdě, což je vzhledem k obecnému nedostatku vody velice pozitivní jev (15).

2.2.3 Aplikace biouhlu na zemědělskou půdu

Vzhledem k tomu, že je biouhel připravován většinou v peletizovaném stavu, lze jeho aplikaci zabezpečit klasickými zemědělskými stroji, jako jsou rozmetadla či secí stroje. Množství dávkovaného biouhlu je uváděno ve velmi širokém rozmezí a to 1 – 50 t.ha⁻¹, nejčastěji ale 5 – 10 t.ha⁻¹. Dávka by měla být stanovena na základě vlastností konkrétního biouhlu a potřeb zemědělské půdy (16). Vědeckých prací a studií, které by se skutečně zabývaly vlivy aplikace tohoto typu biouhlu na zemědělskou půdu, je opět velmi omezené množství. Dostupné informace a případné dopady této aplikace nejsou zcela určitě dostatečně prozkoumány a chybí také legislativa, která by se touto problematikou zabývala.

Hossain a kol. v rámci své studie (22) aplikovali na farmě cherry rajčátek biouhel vyrobený z čistírenských kalů v dávce $10 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$. Biouhel byl vyroben pyrolýzou při teplotě 550°C a bylo v něm identifikováno 16 kovů a stopových prvků. Půda, do které byl biouhel aplikován, vykazovala špatné vlastnosti v důsledku nízké dostupnosti živin. Následnou analýzou cherry rajčátek byly všechny prvky přítomné původně v biouhlu stanoveny pouze v nevýznamných množstvích. Se, Pb, Sn, Cr a As se v rajčatech nacházely dokonce pod limity detekce. Studie potvrdila, že biouhel také zlepšuje dostupnost P, celkového N a dalších významných kationtů, rovněž pozitivně zvýšil pH půdy a produkce plodin vzrostla o 64 %. Kromě toho měl biouhel příznivý vliv na kvalitu půdy, zvýšil kapacitu zadržování vody a zlepšil podmínky prostředí pro růst a rozvoj systémů kořenů rostlin. Podle autorů studie má biouhel z čistírenských kalů potenciál snížit množství používaných hnojiv (22).

Studie X. D. Songa a kol. (23) se zabývala akumulací těžkých kovů v rostlinách po aplikaci biouhlu z pyrolýzy čistírenských kalů, přičemž byl sledován vliv teploty pyrolýzy a poměru biouhel : půda. Biouhel získaný při čtyřech různých teplotách byl aplikován jako doplněk půdy pro pěstování česneku *Allium sativum* L.. Experimentální výsledky ukázaly, že biouhel je bohatý na obsah živin a zlepšuje výnosy česneku. Ačkoliv při srovnání s místní půdou, byl obsah těžkých kovů v biouhlech vyšší, hodnoty spadaly do limitů přijatelných pro aplikaci na půdu. V česneku docházelo k akumulaci těžkých kovů hlavně v kořenech a cibulkách, a to u nejvíce zastoupeného Zn a Cu. Bioakumulace byla podpořena a zvyšovala se s prodlužující se dobou pěstování. Biouhel vyrobený při 450°C , aplikovaný v poměru 1 : 4 (20 % pozn.), vykazoval velmi pozitivní vliv na rychlost růstu česneku, měl vyšší konečné výnosy sušiny v porovnání s referenční půdou a nejnižší obsah těžkých kovů v porovnání s biouhly vyrobených při jiných teplotách. Z výsledků studie tedy vyplývá, že akumulace těžkých kovů v rostlinách může být inhibována správným výběrem teploty pyrolýzy (23).

Vlivem biouhlu získaného z čistírenských kalů na biochemické vlastnosti půdy se zabývala studie Paz-Ferreira a kol. (24). V rámci studie byly použity dvě různé dávky biouhlu (4 a 8 % hm.), porovnány s výsledky získanými u kontrolní půdy a také s výsledky půdy upravené stejnými dávkami nepyrolyzovaného čistírenského kalu. Sledovalo se množství mikrobiální biomasy uhlíku, respirace půdy, čistá mineralizace dusíku a vybrané enzymové aktivity (dehydrogenáza, β -glukosidáza, fosfomoesteráza a arylsulfatáza). Jako index kvality půdy byl použit geometrický průměr enzymových aktivit. Bylo dokázáno zvýšení kvality půd upravených vyšší dávkou biouhlu, a naopak snížení kvality půdy doplněné vyšší dávkou čistírenského kalu, tedy pozitivní vliv pyrolýzy čistírenského kalu na výsledné biochemické vlastnosti půdy (24).

2.3 Produkce biouhlu

Nejběžnějším způsobem výroby biouhlu je pyrolýza. Dále je možné jej vyrobit v pevné formě suchou karbonizací a zplyňováním biomasy, ve formě suspenze pak hydrotermální karbonizací biomasy (25).

Pyrolýza je termochemický proces, při němž se biomasa zahřívá v nepřítomnosti nebo omezeném přívodu kyslíku a dochází k její transformaci. Hlavními produkty pyrolýzy jsou biouhel, pyrolýzní olej a pyrolýzní plyn. Možnosti využití biouhlu již byly v této práci popsány. Pyrolýzní olej je komplexní směs několika stovek organických sloučenin. Skládá se ze dvou fází, vodné fáze, obsahující oksyložené organické sloučeniny s nižší molekulovou hmotností a nevodné fáze, která obsahuje organické sloučeniny, hlavně aromatické látky. Mohl by být použit jako alternativní palivo nebo jako zdroj vysoce hodnotných chemikálií. Posledním produktem pyrolýzy je pyrolýzní plyn, obsahující především H_2 , CO , CO_2 a CH_4 . Přímým spalováním by se dal využít jako zdroj energie v místě aplikace (21) (26).

Existuje několik typů pyrolýzy rozdílných v závislosti na teplotě procesu, rychlosti ohřevu a době zdržení. Mezi základní typy, tzv. konvekční způsoby, patří flash pyrolýza, což je proces velmi rychlého ohřevu, který probíhá při teplotě 400 – 900 °C s krátkou dobou zdržení. Rychlá pyrolýza se liší od flash pyrolýzy v rychlosti ohřevu, která není extrémně vysoká a probíhá za teploty nižší než 600 °C. Během pomalé pyrolýzy se teplota pohybuje kolem 450 – 700 °C při ještě nižších rychlostech ohřevu (26).

Předmětem této diplomové práce je však biouhel vyrobený pomocí mikrovlnné pyrolýzy, proto ji bude věnována následující kapitola.

2.3.1 Mikrovlnná pyrolýza

Mikrovlny mají potenciál poskytovat rychlé a energeticky účinné ohřívání materiálů. Mikrovlnné záření je termín spojený s jakýmkoliv elektromagnetickým zářením v mikrovlnném kmitočtovém rozsahu 300 MHz – 300 GHz. Dochází k rozkmitání molekul materiálu vedoucí k nárůstu teploty. Ne všechny materiály však mohou být rychle zahřívány mikrovlnami. Ty, které mikrovlnné záření absorbují, se nazývají dielektrika. Právě dielektrické materiály obsahující uhlík mají dobrou schopnost absorbovat mikrovlnné záření a převést ho na tepelnou energii (21) (27).

Při běžném ohřevu je teplo z vnějšího zdroje tepla přenášeno na povrch materiálu vedením, konvekcí nebo zářením a následně dochází k přenosu tepla směrem dovnitř. Naopak mikrovlnné záření proniká do materiálu, kde se elektromagnetická energie přemění na teplo, které se hromadí uvnitř a přenáší směrem k povrchu. Proces tedy probíhá v celém objemu materiálu. Tento jedinečný postup inverzního ohřevu nabízí mnoho výhod, jako je rovnoměrné ohřívání materiálu, zvýšení účinnosti přenosu energie a celkové zefektivnění

procesu. Na rozdíl od konvenčních metod je tepelný efekt téměř okamžitý, což umožňuje lepší kontrolu nad samotným procesem bez rizika přehřátí materiálu (27) (28).

Protože biomasa není vždy příliš dobrým absorberem mikrovln, přidávají se ke vstupnímu materiálu různá aditiva, která mohou působit i jako katalyzátory. Ty mohou zvýšit rychlost ohřevu, snížit energii aktivace procesu, zvýšit výtěžek či zlepšit kvalitu produktu (29). Běžně používanými aditivami jsou např. zeolity, aktivní uhlí, dřevěné piliny, seno nebo lignin (21).

Samotný proces mikrovlnné pyrolýzy se odehrává ve speciálním reaktoru v inertní atmosféře (např. N_2 , CO_2). Surovina je vystavena mikrovlnnému záření, zpočátku dochází k sušení, následuje rozklad na plynné a zuhelnatělé látky. Páry procházejí chladiči, kondenzáty se shromažďují v odběrných nádobách a z nekondenzovaných par vzniká bioplyn. Výhodou mikrovlnné pyrolýzy je vyšší rychlost ohřevu, selektivita, přesnost řízení ohřevu, vyšší účinnost přeměny energie a její úspora (30).

2.4 Vybrané metody pro posouzení ekotoxicity

Ekotoxicita je vlastnost látek nebo odpadů, které při uvolňování do životního prostředí představují nebezpečí biologické akumulace nebo toxického účinku na biotické systémy. Ke stanovení ekotoxicity se využívají ekotoxikologické testy. Principem testů je vystavení vybraných testovacích organismů působení testované látky za přesně definovaných podmínek. Každý test je koncipován jinak, a proto se i reakce organismů na působení dané látky liší. Sledovaným endpointem může být mortalita, změny reprodukce, inhibice pohybu, růstu nebo naopak jeho urychlení. Výsledky jsou vždy porovnávány s kontrolním stanovením, které bylo nasazeno za stejných podmínek, ale testovanou látku neobsahuje. Ekotoxikologické testy dělíme podle různých parametrů, nejčastěji v závislosti na délce expozice (testy akutní, subakutní, chronické) nebo podle trofické úrovně testovacích organismů (producenti, konzumenti, destruenti). Aby bylo možno porovnat výsledky testů toxicity v různých zařízeních, je třeba postupovat podle shodných metodik. Jednotlivé metodiky testů jsou proto standardizovány mezinárodními organizacemi jako jsou ISO a OECD (31) (32).

Předmětem této práce je hodnocení ekotoxicity biouhlu vyrobeného z čistírenského kalu a vzhledem k jeho povaze a možnosti uplatnění byly ekotoxikologické testy prováděny jak na půdních tak na vodních organismech.

2.4.1 Testy v kontaktním uspořádání

Testy probíhající v kontaktním uspořádání, označovány též jako testy terestrické, jsou založeny na bezprostředním kontaktu pevné kontaminované matrice s terestrickými organismy a ekosystémy. Dochází k reálné expozici testovaných látek a tyto testy vykazují vyšší citlivost a mají lepší vypovídající hodnotu než testy s vodním výluhem pevné matrice,

protože testovaný materiál může obsahovat látky, které jsou ve vodě rozpustné omezeně nebo vůbec (32).

Pro potřeby této práce byla využita žížala hnojní *Eisenia fetida* jako zástupce půdní fauny. Tento půdní organismus je exponován testované látce hned několika cestami a jeho životní cyklus probíhá celý v půdě. Pro odhad účinků pevné matrice na půdní flóru byly jako zástupci rostlin využity semena salátu setého *Lactuca sativa*.

2.4.2 Testy v akvatickém uspořádání

Tyto testy jsou vhodné pro toxikanty v kapalném stavu, povrchové a odpadní vody, průmyslové chemikálie nebo právě vodné výluhy pevných látek, odpadů, kalů, stavebních materiálů apod. Testy jsou opět založené na přímém kontaktu testované kapalné matrice nebo vodného výluhu s testovacím organismem. Jedná se většinou o akutní testy toxicity s krátkodobou expozicí. Pro posouzení ekotoxicity vodných výluhů by však tyto testy měly sloužit jen jako doplňkové, jak již bylo řečeno, řada látek s nízkou rozpustností ve vodě a hydrofobního charakteru není ve výluhu obsažena. V některých případech by mohlo docházet k podhodnocování ekotoxikologických rizik (31).

V rámci této práce byly použity dva vodní organismy, konkrétně zástupce sladkovodních korýšů hroznatka velká *Daphnia magna* a slanovodních korýšů žábřonožka solná *Artemia salina*. *D. magna* je oproti žábřonožce využívána při standardních ekotoxikologických testech. Test se žábřonožkou je vhodný při vyšší celkové mineralizaci, avšak není moc rozšířený kvůli její nízké citlivosti. Ze zástupců terestrických organismů byly vybrány dvě suchozemské rostliny, respektive semena hořčice bílé *Sinapis alba* a sazečky cibule bílé *Allium cepa* L.. Obě rostliny byly v přímém kontaktu s vodným výluhem a byl posuzován jeho vliv na vývoj růstu kořene.

2.5 Ekotoxicita biouhlu

Ekotoxicita biouhlu je podmíněna půdní reakcí (pH), elektrickou vodivostí, jeho elementárním složením, obsahem popela, přítomností iontů, stopových prvků a organických nečistot. Vzhledem k tomu je velice obtížné stanovit jasný vztah mezi těmito faktory a ekotoxicitou biouhlu (33). Studií, které by se zabývaly ekotoxikologickým hodnocením biouhlu z čistírenských kalů bylo doposud provedeno jen velmi omezené množství.

V nedávné studii Simóna a kol. (34) byly charakterizovány a analyzovány 2 typy biouhlu vyrobené pyrolýzou městského dřevního odpadu a splaškového kalu zahříváním v pyrolytické peci při teplotách do 500 °C po dobu 30 minut. Oba typy vykazovaly různé fyzikálně-chemické vlastnosti a obsahy kovů. Pro posouzení ekotoxikologického rizika byly oba typy biouhlu smíchány s nekontaminovanou přírodní půdou Lufa 2.2 v koncentracích 500, 250, 125, 62,5 a 31,3 g.kg⁻¹. Následně byly testovány na roupicích *Enchytraeus*

crypticus, které patří do skupiny půdních bezobratlých živočichů. Po 21 dnech expozice byla hodnocena mortalita (LC_{50}) a účinky na reprodukci (EC_{50} a EC_{20}). Biochar vyrobený z čistírenských kalů vykazoval lepší výsledky a ani nejvyšší testovaná koncentrace nevykazovala dostatečné inhibiční účinky, aby mohla být vypočtena hodnota LC_{50} . Co se týče vlivu na reprodukci, pro biouhel z čistírenských kalů byla vypočtena hodnota EC_{20} na 462 g.kg^{-1} . Autoři také uvádí odhadovanou dávku biouhlu z čistírenských kalů, u které nedochází k nepříznivým účinkům na $11,5 \text{ t.ha}^{-1}$ (34).

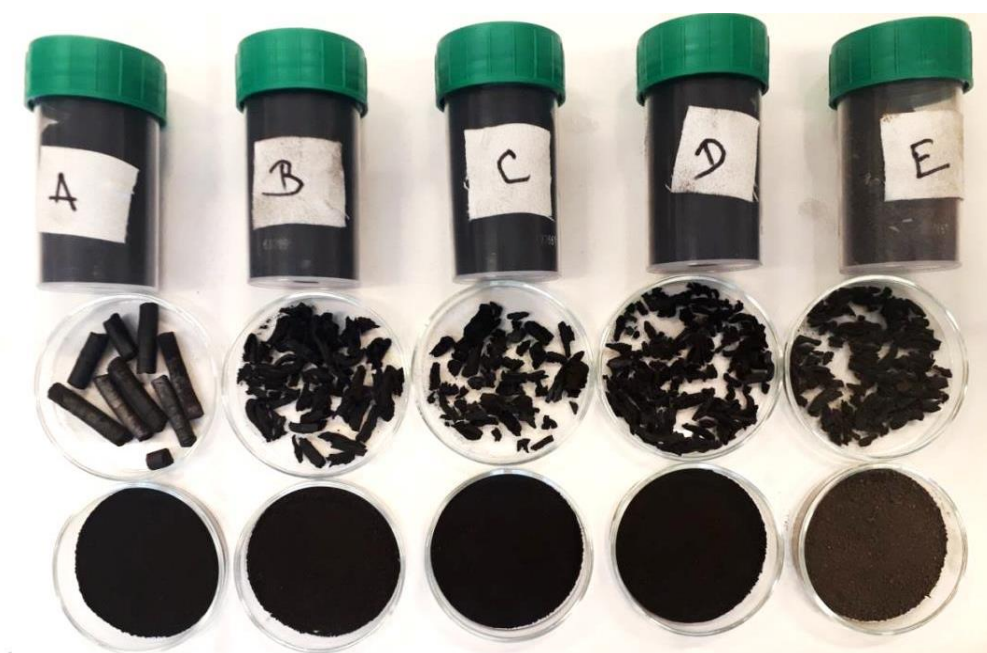
Studie polských vědců (33) porovnávala účinky biouhlu vyrobených z různých čistírenských kalů na fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti půdy, ekotoxicitu a výnos rostlin. Tři vzorky biouhlu vyrobené při teplotě $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ byly aplikovány do kyselé písčité půdy v dávkách 0,5; 1; 2 %. Co se týče ekotoxicity, byl proveden test inhibice luminiscence na bakteriích *Vibrio fischeri* a chronický test toxicity s korýšem *Heterocypris incongruens* (OSTRACODTOXKIT F). U testu s *V. fischeri* byl vliv biouhlu klasifikován jako málo toxický. Nebyla pozorována žádná korelace mezi aplikovanou dávkou a inhibicí luminiscence. Jediným faktorem, který měl vliv na aktivitu *V. fischeri* byl kal, ze kterého byl biouhel vyroben. Použití testu OSTRACODTOXKIT F ukázalo, že přidání biouhlu do půdy mělo pozitivní vliv na nárůst biomasy oproti kontrole a to bez ohledu na dávku. Autoři tedy doporučují jako vhodnou dávku biouhlu 1 – 2 % (33).

Další prací hodnotící ekotoxicitu biouhlu z čistírenských kalů je studie Zielińska a Oleszczuka (35). Ta byla posuzována prostřednictvím testu fytotoxicity v kontaktním uspořádání na řeřiše seté *Lepidium sativum* a prostřednictvím vodného výluhu na bakteriích *V. fischeri* a sladkovodním korýši *D. magna*. Testovány byly nejenom různé kaly, ale také biouhly, které z nich byly vyrobené při odlišných teplotách (500 , 600 a $700 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Výsledky testu na řeřiše seté *L. sativum*, při kterém byl kal i biouhel aplikován v dávce 1 % hm., dokazují významné snížení toxicity kalu po jeho termické úpravě. Nejnižší toxicitu vykazovaly biochary vyrobené při teplotě $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$, které měly na růst rostliny dokonce stimulační efekt. Všechny kaly byly taktéž významně toxické pro bakterii *V. fischeri* oproti testovaným biouhlům. Pyrolýza kalů, podobně jako v případě *L. sativum*, způsobila významné snížení toxicity výluhů většiny testovaných biouhlů. Pro korýše *D. magna* vykazovaly nejnižší toxicitu vzorky všech biouhlů vyrobených při teplotě $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$, nejvyšší toxicitu vzorky biocharu vyrobených při $700 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nejvíce toxické v tomto případě nebyly surové kaly, jak tomu bylo u předchozích dvou testů. Výluhy byly pro potřeby obou testů zředěny 10x (35).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Testovaný materiál

V rámci této práce byly testovány čtyři různé vzorky biocharu vyrobeného z čistírenského kalu, který pocházel ze dvou různých ČOV, označených jako ČOV I a ČOV II. Jako pátý vzorek byl pro srovnání ekotoxikologických účinků před a po pyrolýze vybrán sušený granulovaný kal, který byl surovinou pro přípravu jednoho ze vzorků biouhlu. Všechny vzorky biouhlu byly připraveny mikrovlnou pyrolýzou ve výzkumném centru AdMaS v Brně.



Obrázek 2 – Testovaný materiál (zdroj vlastní foto)

Vzorek A

Vzorek A je označení pro směsný vzorek čtyř biouhlů. Před samotnou pyrolýzou byl kal peletizován za 30% přídatku sena a vysušen. Při procesu pyrolýzy bylo dosaženo maximálně 260 °C při maximálním výkonu magnetronu 2,7 kW. U každého z dílčích vzorků byla aplikována jiná délka ozařování, konkrétně 30, 45 a dva vzorky 60 minut. Směsný vzorek byl vytvořen kvůli nedostatečnému množství dílčích vzorků, které by nepostačovalo pro provedení všech testů. Surovinou pro výrobu těchto biocharů byl čistírenský kal pocházející z ČOV I – lokalita ČOV Dražovice (Karlovy Vary). Jedná se o komunální mechanicko-biologickou ČOV o kapacitě 80 000 EO. Čistírna je vybavena biologickým odstraňováním dusíku a fosfor je zde srážen chemicky.

Vzorek B

Vzorek B je označení pro směsný vzorek dvou vzorků biouhlu. Směsný vzorek byl vytvořen opět kvůli nedostatečnému množství dílčích vzorků. Surovinou pro výrobu obou těchto dílčích vzorků byl kal pocházející z ČOV I. Vzorky nebyly peletizovány a nebyly k nim přidány další aditiva. Mikrovlnná pyrolýza proběhla na zařízení Bionic fuel za celkové délky ozařování 60 min. Rozdílnými parametry mezi dílčími vzorky byla maximální teplota dosažená během pyrolýzy a maximální výkon magnetronu. U prvního dílčího vzorku dosáhla teplota maximálně k 152 °C a maximální výkon magnetronu byl 1 kW. U druhého dílčího vzorku bylo dosaženo maximálně 253 °C za maximálního výkonu magnetronu 2 kW. Vzorky byly smíchány v poměru 1:1.

Vzorek C

Surovinou pro výrobu vzorku C byl kal pocházející z ČOV II. Jedná se o čistírenský kal, který byl vysušen na pásové sušárně (sušina cca 90 %) z lokality Ingolstadt v Německu. Před vlastní pyrolýzou neproběhla peletizace a vzorek je bez dalších aditiv. Mikrovlnná pyrolýza proběhla na zařízení Bionic fuel za celkové doby ozařování 170 min. Maximální dosažená teplota pyrolýzy byla 253 °C při výkonu magnetronu maximálně 3 kW.

Vzorek D + E

Jako vzorek D je označen biouhel, pocházející opět z ČOV I. Proces jeho přípravy byl zahájen při teplotě 18 °C a bylo dosaženo maximální teploty 231 °C. Ozařování probíhalo 90 minut při výkonu mikrovlnného záření 130 MW/V.

Surovinou pro přípravu biouhlu D byl suchý granulovaný kal, v této práci označován jako vzorek E. Surový kal byl prvně zahuštěn ve flotační nádrži nebo zahušťovací odstředivce. Následně proběhla stabilizace zahuštěného kalu ve vyhnívacích nádržích a homogenizace s kaly přiváženými z okolních čistíren, které nemají vlastní kalovou koncovku. Homogenizovaný kal byl opět odvodněn na odstředivkách a nakonec proběhlo sušení pomocí horkého vzduchu v nízkoteplotní pásové sušárně kalů za vzniku suchého granulátu s obsahem sušiny 90 %.

3.2 Testy v kontaktním uspořádání

V rámci této práce byly provedeny celkem 3 testy ekotoxicity v kontaktním uspořádání, konkrétně na organismu *E. fetida* to byl test únikového chování a test reprodukce. Z testů fyto toxicity byl proveden test inhibice kořene salátu *L. sativa*.

Pro potřebu všech kontaktních testů byly vzorky biouhlu nejprve rozemlety na jemné částice na laboratorním elektrickém mlýnku, aby byla zajištěna lepší homogenizace testovaného materiálu v kontrolní půdě a také, aby bylo zamezeno vlivu rozdílné velikosti povrchu testovaného materiálu. Poté byly smíchány se standardní nebo umělé půdou

v určitých poměrech. Koncentrační řada byla zvolena na základě předpokládaných dávek biouhlu do půdy, kde nižší koncentrace symbolizují právě předpokládané dávkování a vyšší koncentrace případné nadužívání biouhlu. Přepočet procentuálního zastoupení biouhlu v půdě na dávku vyjádřenou v $\text{t} \cdot \text{ha}^{-1}$ byl vytvořen na základě předpokladu objemové hmotnosti půdy $1,2 \text{ t} \cdot \text{m}^{-3}$ a aplikace biouhlu do hloubky 10 cm. Přibližné přepočty jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1 – Přepočet testovaných koncentrací na dávku

c (%)	0,5	1	2,5	5	10
c ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	5	10	25	50	100
c ($\text{t} \cdot \text{ha}^{-1}$)	6	12	30	60	120

3.2.1 Půdní matrice a stanovení jejích vlastností

Jako zkušební matrice byla u testu na žížalách použita standardní půda, konkrétně Lufa 2.2 a u testu inhibice kořene salátu laboratorně připravená umělá půda. Obě jsou považovány za vhodné při hodnocení ekotoxicity v půdách a doporučovány normami OECD. Pro potřeby testů i zhodnocení výsledků byly stanoveny hodnoty pH a maximální vodní kapacity (WHC_{max}) u obou půd i u všech testovaných vzorků koncentrační řady.

Standardní půda Lufa 2.2

Tato standardní půda je dodávána německou společností Lufa Speyer. Půda je specifická v tom, že není míchána z jednotlivých složek, ale jedná se skutečně o přírodní půdu těženou ve vybraných oblastech Německa. V těchto oblastech nejsou používány pesticidy, biocidní přípravky ani organická hnojiva po dobu minimálně pěti let a minerální hnojiva minimálně 3 měsíce před odběrem. Půda je těžena z hloubky 0 – 20 cm a po vysušení se pomocí sít oddělují částice menší než 2 mm, které jsou dále distribuovány (36). Standardní půda Lufa 2.2 je vhodnější pro použití v testech s žížalami a byly u ní zaznamenány lepší výsledky reprodukce než při použití umělé půdy. Jelikož se jedná o přírodní půdu, před jejím využitím do testů nebyla nijak upravována (37).

Umělá půda OECD 207

Jedná se o umělou půdu, která je běžně využívána při kontaktních testech ekotoxicity. Složení umělé půdy je přesně definováno normou OECD 207. Půda se skládá ze 70 % jemného křemenného písku, který obsahuje více než 50 % zrn o velikosti 0,05 – 0,2 mm, 20 % kaolinového jílu s obsahem kaolinu minimálně 30 % a 10 % jemné rašeliny, která byla přesáta a homogenizována přes 2 mm síto. Tato směs by měla mít hodnotu pH optimálně $6,0 \pm 0,5$ a vodní kapacita by se měla pohybovat v rozmezí 35 – 40 % (38).

Postup přípravy: Všechny složky půdy byly nejprve rozprostřeny a v tenkých vrstvách ponechány k usušení na několik dní v laboratoři. Suché složky byly přesety přes síto velikosti 2 mm a větší hrudkovité částice jílu byly pomocí třecí misky a tloučku rozetřeny. Nakonec byla umělé půda připravena smícháním všech složek v předepsaných poměrech (38).

Stanovení hodnoty WHC_{max}

Maximální vodní kapacita půdy, neboli WHC_{max} (Maximum Water Holding Capacity) je stav, kdy je půda schopná udržet největší množství vody ve svých pórech. Je vyjadřována v jednotkách objemu vody na gram suché půdy (39).

Postup stanovení: 50 g suché půdy bylo naváženo a umístěno do předem zváženého a vysušeného skleněného válce, který má dno tvořené polopropustným materiálem. Válečkem bylo poklepáno, aby zemina usedla a následně byl umístěn do nádoby s vodou takovým způsobem, aby byla hladina vody ve výšce sloupce vzorku. Po 3 hodinách byl válec umístěn na misku s pískem a tkaninou na povrchu. Pro zamezení vysoušení vzorku byla miska zakryta další tkaninou. Po 3 hodinách byl váleček zvážen a poté každých 30 minut do konstantní hmotnosti. Hodnota WHC_{max} byla vypočítána dle rovnice [1], kde M_{vz} je hmotnost nasycené zeminy i s válcem v gramech a M_k je hmotnost válce v gramech (39).

$$WHC_{max} = \frac{M_{vz} - M_k - 50}{50} \quad [1]$$

Stanovení hodnoty pH

Do větší kónické zkumavky bylo přidáno 5 ml suché půdy a následně doplněno na 30 ml celkového objemu 1M roztokem KCl. Suspenze byla třepána po dobu pěti minut a následně nechána v klidu po dobu minimálně dvou hodin. Po následném protřepání bylo pomocí kalibrovaného pH metru InoLab pH 7110 změřeno pH suspenze. Hodnota pH byla stanovena u všech vzorků dvakrát a výslednou hodnotou je jejich aritmetický průměr (40).



Obrázek 3 – Vlevo měření pH, vpravo stanovení WHC (zdroj vlastní foto)

3.2.2 Test únikového chování se žížalami dle normy ISO 17512-1

Jedná se o rychlý screeningový test používaný pro hodnocení půdy a posuzování vlivu polutantů a chemikálií na chování žížal. Právě žížaly jsou velmi důležitou součástí půdy, kde se podílejí na její provzdušňování, dekompozici a tvorbě humusu. Jsou to bezobratlí živočichové, řadí se mezi kroužkovce *Annelida* do třídy maloštětinatců *Oligochaeta*. Použitý organismus *E. fetida* patří konkrétně do čeledi žížalovití *Lumbricidae* a rodu *Eisenia*. Namísto žížaly hnojní je možné použití její blízké příbuzné žížaly kalifornské *Eisenia andrei* (32). Test byl proveden na základě postupu dle normy ISO 17512-1 (41).

Tento test je koncipován jako dvoukomorový a jeho principem je vystavení určitého počtu organismů kontrolní a kontaminované půdě ve stejném čase. Obě půdy se nachází ve stejné testovací nádobě a žížaly mají možnost migrace a preference té vhodnější. Doba trvání tohoto testu je 48 hodin.

Byly vybrány 3 koncentrace u všech vzorků, které byly tímto způsobem testovány, a to 0,5; 5 a 10 %. Test by mohl sloužit také k odhalení nesprávně zvolených koncentrací testovaného kontaminantu v případech vyšší míry únikovosti v nízkých koncentracích nebo nižší míry únikovosti v nejvyšších koncentracích.

Postup práce:

Příprava organismů na testování: z chovů byli pro testování vybráni dospělí jedinci ve stáří 2 – 12 měsíců, s vyvinutým opaskem o hmotnosti 250 – 600 g. Tito jedinci byli následně omyti vodou, jemně osušeni na papírové utěrce a napočítáni po deseti kusech na krabičku.

Nasazení organismů do testu: test probíhal v označených obdélníkových plastových miskách rozdělených přepážkou. Na jednu polovinu misky bylo naváženo 250 g kontrolní půdy a nasyceno destilovanou vodou na její WHC_{max} . To samé bylo provedeno na druhé polovině misky se směsí půdy a testované látky. Z takto připravených testovacích misek byla odstraněna přepážka a na rozhraní obou matric bylo přidáno 10 organismů. Všechny nádoby byly zakryty potravinovou folií s několika otvory pro cirkulaci vzduchu a uloženy v klimatizované místnosti při teplotě 22 °C a pod stálým osvětlením. Expozice trvala po dobu 48 hodin, během které organismy nebyly krmeny. Všechny testované koncentrace byly nasazeny ve 3 opakováních.

Vyhodnocení testu: po 48 hodinách byl test ukončen, obě půdy byly opět odděleny přepážkou a v každém testovaném substrátu byl zaznamenán počet jedinců. V případě výskytu jedince na rozmezí byl přiřazen do té části, ve které se vyskytovala přední část jeho těla. Počty organismů v kontrolní i kontaminované půdě byly porovnány a na základě jejich preferencí byla vyhodnocena míra únikového chování žížal NR (net response = čistá odpověď), která se vyjadřuje v procentech a byla vypočtena dle rovnice [2]

$$NR = \frac{(K-T) \cdot 100}{N} \quad [2]$$

kde K je počet organismů v kontrolní matrici, T je počet nalezených jedinců v testované matrici a N je celkový počet jedinců. Tento výpočet vychází z předpokladu homogenní distribuce organismů mezi kontrolní (50 %) a testovanou matricí (50 %). Jestliže míra únikovosti organismů dosahuje 80 % a více, prostředí je považováno za toxické nebo se sníženou kvalitou (41).



Obrázek 4 – Testovací miska s nasazeným testem únikového chování žížal (zdroj vlastní foto)

3.2.3 Test reprodukce žížal dle ČSN ISO 11268-2

Tento test slouží pro hodnocení vlivů chemikálií a půdních kontaminantů na reprodukci, sledování mortality a inhibice hmotnostního přírůstku testovacích organismů *E. fetida*. Jedná se o semichronický test o celkové délce 56 dní a celý jeho postup byl proveden podle normy ČSN EN ISO 11268-2. (42)

V průběhu testu byli dospělí jedinci vystaveni přímému působení testovaných vzorků smíchaných se standardní půdou v určitých poměrech. V testovacích nádobách byla udržována příslušná vlhkost a organismy byly krmeny pravidelně jednou týdně. Celkem bylo testováno pět koncentrací s obsahem biouhlu 0,5; 1; 2,5; 5 a 10 % a kontrola, vše ve 3 opakováních.

Postup práce:

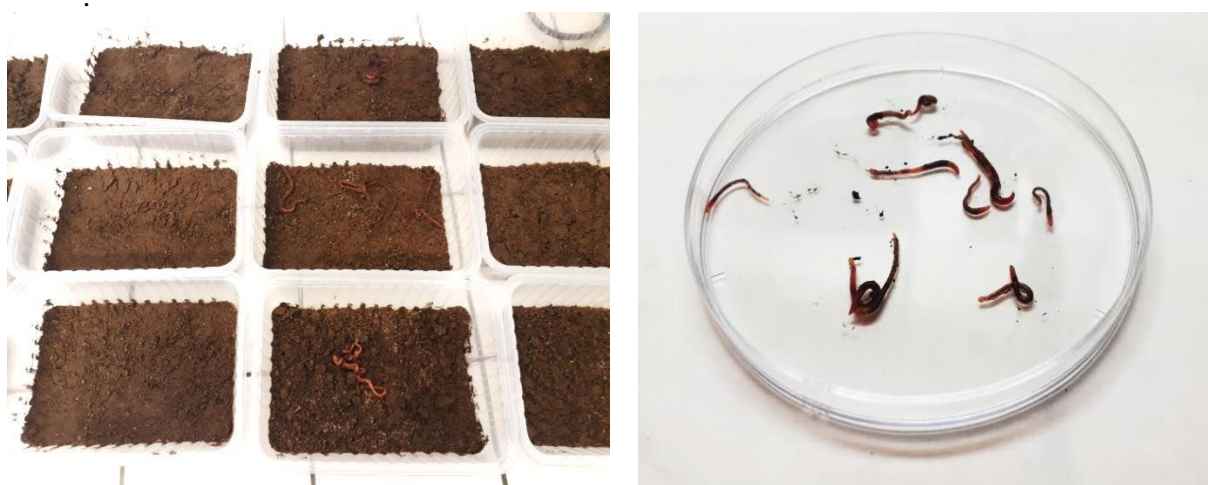
Příprava organismů na testování: z chovů byli pro testování vybráni dospělí jedinci ve stáří 2 – 12 měsíců, s vyvinutým opaskem o hmotnosti 250 – 600 g. Tito jedinci byli následně omyti vodou, jemně osušeni na papírové utěrce, rozdělení po pěti kusech a zvažení.

Nasazení organismů do testu: test probíhal v označených obdélníkových plastových nádobách, do kterých bylo naváženo 250 g testované půdy a nasyceno destilovanou vodou na WHC_{max} , která byla předem stanovena. Do každé misky bylo přidáno 2,5 g mletého koňského hnoje (0,5 g na jedince), lehce zahrabáno a ovlhčeno vodou. Do takto připravených testovacích misek bylo přidáno 5 předem zvážených organismů. Všechny nádoby byly zakryty potravinovou fólií s několika otvory pro cirkulaci vzduchu, uloženy v klimatizované místnosti při teplotě 22 °C a pod stálým osvětlením. Všechny testované koncentrace včetně kontroly byly nasazeny ve 3 opakováních. Během testu byly organismy krmeny jednou týdně stejnou dávkou mletého koňského hnoje jako na začátku testu. Třikrát týdně bylo do jednotlivých nasazení doplněno příslušné množství destilované vody a to kvůli udržení konstantní vlhkosti půdy.

Vyhodnocení testu: po 28 dnech byly organismy vyjmuty z testovacích nádob, opatrně umyty, osušeny a zváženy. Obsah nádoby byl opatrně vysypán na tác a byl zaznamenán počet nalezených kokonů. Vše bylo vráceno zpět do testovacích nádob včetně přeživších žížal. Po dalších 28 dnech byl postup zopakován, přeživší dospělí jedinci byli zváženi, obsah misky byl prohledán a následně byl zaznamenán počet juvenilů. Porovnáním počtu organismů v kontrolním testu s počtem organismů v testované matrici byla podle rovnice [3] vypočtena procentuální míra mortality.

$$M = \frac{(N_c - N_i) \cdot 100}{N_c} \quad [3]$$

N_c je počet živých jedinců v kontrolním nasazení a N_i je počet živých jedinců v testované koncentraci. Obdobně byla vypočtena procentuální míra inhibice reprodukce oproti kontrole (I_r) a procentuální inhibice hmotnosti oproti té původní (I_m).



Obrázek 5 – Vlevo nasazení testu, vpravo počítání juvenilů (zdroj vlastní foto)

3.2.4 Test stanovení inhibice růstu kořene salátu dle ČSN EN ISO 11269-1

Test inhibice růstu kořene salátu setého je jedním z terestrických kontaktních testů, který je používán pro hodnocení fyto toxického účinku a patří mezi testy pro hodnocení ekotoxicity odpadů dle Vyhlášky č. 94/2016 Sb. Test byl proveden podle technické normy ČSN EN ISO 11269-1 (43).

Podstatou testu je přímý kontakt naklíčených semen *L. sativa* s testovanou matricí a následné porovnání průměrné délky kořene v testované koncentraci s průměrnou délkou kořene v kontrole po 120 ± 2 hodinové inkubaci. Z těchto hodnot je dále vypočtena míra inhibice/stimulace růstu kořene oproti kontrole.

Postup práce:

Předklíčení semen: nepoškozená semena salátu (odrůdy Safír) se nechala předklíčit v Petriho misce na filtračním papíře zvlhčeném destilovanou vodou po dobu 24 – 28 hodin, při laboratorní teplotě za tmy. Pro zkoušku byla následně vybrána naklíčená semena s kořínkem max. 2 mm.

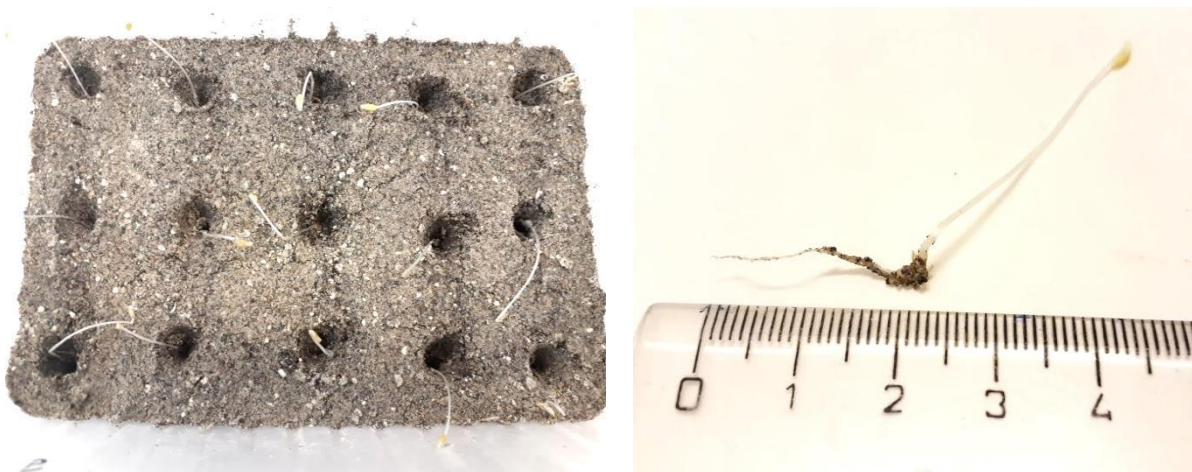
Nasazení testu: test probíhal v označených obdélníkových plastových nádobách, do kterých bylo naváženo 300 g testované matrice a nasyceno destilovanou vodou na 40 % WHC_{max} , která byla stanovena předem. Na povrchu byla vytvořena pravoúhlá síť jamek hlubokých 0,5 – 1 cm (3x5 bodů). Do každé vytvořené jamky bylo pomocí pinzety opatrně přeneseno jedno naklíčené semeno salátu a to tak, aby kořínek směřoval směrem dolů. Semena byla k matrici jemně přitlačena, ale ne zahrabána. Nádoby byly překryty potravinovou fólií a uloženy k inkubaci při 24 ± 2 °C bez přístupu světla. Každá testovaná koncentrace včetně kontroly byla nasazena ve 3 paralelních opakování.

Vyhodnocení testu: po 120 ± 2 hodinách inkubace byl salát jemně oddělen od pevné matrice a byla změřena a zaznamenána délka kořene s přesností na 1 mm. Pokud předklíčené semeno nevytvořilo kořínek, započítala se tato hodnota jako nulová. Průměrná délka kořene salátu v kontrole musí být minimálně 15 mm. Procentuální inhibice růstu kořene I byla vypočtena na základě rozdílu průměrné délky kořene v kontrole a v testované matrici podle rovnice [4].

$$I = \frac{(L_c - L_i) \cdot 100}{L_c} \quad [4]$$

L_c je průměrná délka kořene v kontrolním nasazení a L_i je průměrná délka kořene v testované matrici. Pokud je hodnota $I < 0$, má testovaná matrice stimulační účinky. Výsledné hodnoty procentuální inhibice byly vyneseny do souřadnicového systému oproti koncentracím vyjádřených pomocí logaritmických hodnot. Hodnota IC_{50} byla vypočtena za pomoci lineární

regrese křivky dávka-odpověď. Prostřednictvím Dunnettova testu byla určena statistická významnost odlišnosti zjištěných délek kořínků ve všech matricích oproti kontrole. Účelem této analýzy je určení významné odlišnosti od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Příklad výpočtu a Dunnettova tabulka jsou obsaženy v Příloze 3 a 4.



Obrázek 6 – Vlevo testovací nádoba, vpravo měření délky kořene *L. sativa* (zdroj vlastní foto)

3.3 Testy v akvatickém uspořádání

Pro objektivní posouzení vlivů vodných výluhů jednotlivých vzorků biouhlu byly vybráni zástupci vodních bezobratlých organismů, sladkovodní a slanovodní korýš *D. magna* a *A. salina*, u kterých byla sledována imobilizace/mortalita organismu a terestrické rostliny *S. alba* a *A. cepa*, u níž byla posuzována inhibice růstu kořene.

3.3.1 Příprava vodných výluhů

Pro potřebu testů v akvatickém uspořádání byly připraveny vodné výluhy v souladu s ČSN EN 12 457-4 (83 8005) (44).

Postup práce:

Nejprve byl stanoven obsah sušiny všech vzorků dle metodiky ČSN ISO 11465 sušením vzorku při teplotě 105 ± 5 °C do konstantní hmotnosti. Pro přípravu 0,5 l vodného výluhu bylo naváženo stanovené množství sušiny vzorku, převedeno do pečlivě vymyté plastové vzorkovnice a doplněno takovým množstvím destilované vody, aby bylo se vzorkem v poměru 10:1. Připravené vzorkovnice byly pečlivě uzavřeny a připevněny do laboratorní třepačky Heidolph REAX 20. Vyluhování probíhalo v třepačce automatickým otáčením vzorkovnic metodou „hlava – pata“ po dobu 24 hodin při otáčkách 5 až 10 ot.min⁻¹. Po uplynutí této doby byly vzorkovnice ponechány 15 minut ve statické poloze sedimentovat.

Výluhy byly následně zfiltrány pomocí filtračního papíru a Büchnerovy nálevky za sníženého tlaku. Hodnoty pro přípravu 0,5 l výluhu, vypočtené podle ČSN EN 12 457-4, jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2 – Hodnoty pro přípravu 0,5 l vodného výluhu

	A	B	C	D	E
Sušina (%)	98	97	98	97	93
m_{vzorku} (g)	51	51,5	51	51,5	53,5
V_{H₂O} (ml)	499	498,5	499	498,5	496,5

3.3.1 Test akutní toxicity na perloočkách *D. magna*

Prostřednictvím tohoto testu byl sledován akutní vliv testovaných výluhů na imobilizaci či mortalitu organismu *D. magna*. Testovací sada (Daphtoxkit FTM) obsahuje materiál pro provedení testu včetně ephippií (klidové stádium organismu). Jedná se o akutní test toxicity a doba expozice, po které je odečítán počet uhynulých nebo imobilizovaných jedinců je stanovena na 24 a 48 hodin. Celková doba testu je ovšem 5 dní, 72 hodin je potřeba k vylíhnutí organismu za přesně stanovených podmínek (45).

Postup práce:

Příprava standardní sladké vody (SSV): vialky č. 1 – 4 s roztoky solí NaHCO₃, CaCl₂, MgSO₄ a KCl, byly převedeny do odměrné baňky o objemu 2 l, doplněny destilovanou vodou po rysku a obsah baňky byl promíchán. SSV je v souladu s mezinárodní normou pro akutní imobilizační test na perloočkách *D. magna*, ISO 6341. Před použitím do testu byla SSV provzdušňována po dobu 15 minut.

Příprava a zpracování vzorků: pro přípravu koncentrační řady jednotlivých vzorků v rozsahu 0 – 1000 ml.l⁻¹ byla pro ředění použita SSV.

Líhnutí ephippií: líhnutí bylo zahájeno vždy tři dny před samotným testováním. Obsah vialky s ephippiemi byl opatrně převeden do mikrosíta a pod jemným proudem vody z něj bylo odstraněno konzervační médium. Opláchnutá ephippia byla převedena do kádinky obsahující SSV a nechána inkubovat při teplotě 20 °C po dobu 72 hodin za kontinuálního osvětlení. Dvě hodiny před nasazením do testu byl organismus krmen několika kapkami kultury chlorokokální řasy. K testování se používají juvenilní jedinci mladší 24 hodin.

Nasazení organismu do testu: testování probíhalo na testovací desce, která je tvořena šesti testovacími šachtami v pěti sloupcích. První sloupec šachet se používá jako mycí prostor, aby nedocházelo k rozředování vzorku SSV. První řada slouží obvykle pro kontrolní test a celkem lze v desce testovat 5 různých koncentrací, maximálně ve čtyřech opakováních.

Do každé testovací šachty bylo napipetováno 10 ml příslušného vzorku. Vždy 5 jedinců bylo převedeno pomocí plastové pipety do mycí šachty a následně do testovací šachty. Do každé koncentrace bylo takovýmto způsobem nasazeno 15 – 20 jedinců. Takto připravená testovací deska byla překryta parafilmem a uložena k inkubaci při 20 °C bez osvětlení (45).



Obrázek 7 – Vlevo testovací deska, vpravo organismus *D. magna* (zdroj vlastní foto)

Vyhodnocení testu: po 24 a 48 hodinách byli spočítáni živí jedinci v každém nasazení a na základě těchto hodnot byla vypočtena procentuální míra imobilizace podle rovnice [5]

$$\text{Imobilizace} = \frac{(N_c - N_i) \cdot 100}{N_c} \quad [5]$$

N_c je počet živých jedinců v kontrolním nasazení a N_i je počet živých jedinců v testované koncentraci. Výsledné hodnoty procentuální imobilizace byly vyhodnoceny pomocí probitové analýzy. Probitové hodnoty, které přísluší jednotlivým hodnotám imobilizace (viz Příloha 5) byly vyneseny do souřadnicového systému oproti koncentracím vyjádřených v logaritmických hodnotách a prostřednictvím lineární regrese byly vypočteny hodnoty efektivního účinku 24hEC50 a 48hEC50.

3.3.2 Test akutní toxicity na žábřonožkách *A. salina*

Cílem testu akutní toxicity na žábřonožkách je podobně jako u *D. magna* určení akutního vlivu testovaných výluhů na imobilizaci či mortalitu organismu. *A. salina* je velmi odolný organismus, dokáže přežít ve vodách s velkými výkyvy množství solí. Organismus by měl být schopen přežít bez potravy až 120 hodin po vylíhnutí, ale pro potřeby testu byla stanovena doba expozice jen na 72 hodin (46).



Obrázek 8 – Slanovodní korýš *Artemia salina* (47)

Postup práce:

Příprava laboratorní mořské vody: pro přípravu jednoho litru byly nejprve připraveny zásobní roztoky ZR1 a ZR2 podle Tabulky 3. Navážky pro dané zásobní roztoky byly kvantitativně převedeny do 100 ml odměrných baněk, doplněny destilovanou vodou po rysku a zamíchány. Navážky obou krystalických solí rozpuštěných ve 200 ml destilované vody byly převedeny do 1 l odměrné baňky. Do této baňky bylo následně přidáno 20 ml roztoku ZR 1 a 10 ml roztoku ZR 2, baňka byla doplněna po rysku a zamíchána (46).

Tabulka 3 – Složení laboratorní mořské vody pro testy na *A. salina*

	chemikálie	navážka (g)		chemikálie	navážka (g)
Krystalické soli	NaCl	23,960	ZR 2	CaCl ₂	2,998
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10,346		NaHCO ₃	2,010
ZR 1	MgCl ₂ ·6H ₂ O	32,500		SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,270
	NaBr	5,145		H ₃ BO ₃	0,060
	KCl	2,980		NaF	0,042

Příprava a zpracování vzorků: pro přípravu koncentrační řady jednotlivých vzorků v rozsahu 0 – 1000 ml.l⁻¹ byla pro ředění použita laboratorní mořská voda.

Líhnutí nauplií: cysty byly již dodány ve směsi solí vhodných k líhnutí organismu. Lžička směsi byla smíchána s 250 ml dest. vody a roztok se pomalu nechal probublávat. Líhnutí probíhalo za stálého osvětlení při teplotě 25 – 27 °C po dobu 24 – 28 hodin.

Nasazení organismu do testu: testování probíhalo v testovací desce, do každé šachty bylo napipetováno 5 ml testovaného vzorku a obdobným způsobem jako u *D. magna* bylo do každé šachty nasazeno 10 jedinců pomocí plastových pipet. Do každé koncentrace bylo takovýmto způsobem nasazeno 30 – 40 jedinců. Takto připravená testovací deska byla

překryta parafilmem a uložena k inkubaci při 20 °C bez osvětlení. Organismy nebyly po celou dobu testu nijak krmeny.

Vyhodnocení testu: po 24, 48 a 72 hodinách byli spočítáni živí jedinci v každém nasazení. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno stejně jako u organismu *D. magna*. Byla vypočtena procentuální míra imobilizace a hodnoty efektivního účinku 24(48;72)hEC50 (46).

3.3.3 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *S. alba*

Během tohoto testu fytotoxicity byla semena hořčice bílé vystavena po dobu 72 hodin účinkům testovaných výluhů. Po uplynutí této doby byl zjištěn počet vyklíčených semen a délky kořenů jednotlivých rostlin byly porovnány s kontrolou. Principem testu je kultivace semen na podložkách, které jsou nasyceny roztokem testované látky ve srovnání se semeny rostoucími na podložkách nasycených ředící vodou. Test probíhal v souladu s Metodickým pokynem odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů (48).



Obrázek 9 – Vlevo semena *S. alba* (49) vpravo měření délky kořene (zdroj vlastní foto)

Postup práce:

Příprava a zpracování vzorků: pro přípravu koncentrační řady jednotlivých vzorků v rozsahu 0 – 1000 ml.l⁻¹ byla pro ředění použita SSV – standardní sladká voda, stejná jako pro test na organismu *D. magna*.

Nasazení testu: testování probíhalo v Petriho miskách. Dno misky bylo vyloženo filtračním papírem, na který bylo napipetováno 2 ml testovaného vzorku. Na takto zvlhčený filtrační papír bylo v pravidelných řadách nasazeno vždy 20 semínek. Byla vybrána zdravá, okrově žlutá semena bez znaků poškození o stejné velikosti v rozmezí 1,5 až 2 mm. Pro dodržení validace testu musela semena vykazovat klíčivost v kontrole minimálně 90 %. Uzavřené Petriho misky byly uloženy k inkubaci při teplotě 20 °C po dobu 72 hodin. Všechny testované koncentrace včetně kontroly byly nasazeny ve třech opakováních.

3.3.4 Test inhibice růstu kořenů cibule *A. cepa*

Postup práce:

Nasazení testu: malé a nízké zkumavky byly naplněny testovanými roztoky a na jejich hrdla byly nasazeny sazečky cibule, které byly den před zahájením testu zbaveny svrchní slupky a rehydratovány ve vodovodní vodě. Pro každou testovanou koncentraci i kontrolu bylo nasazeno 6 cibulek. Zkumavky s nasazenými cibulkami byly uloženy za světelných podmínek běžného dne po dobu 7 dní při teplotě 20 ± 2 °C. V průběhu testu byla do zkumavek doplňována ubylá voda.

Vyhodnocení testu: po sedmi dnech byla změřena a zaznamenána délka kořínků hmotnost biomasy v každém nasazení. Výsledky testu byly zpracovány obdobným způsobem jako u organismu *L. sativa*. (kap. 3.2.4).



Obrázek 10 – Vlevo nasazení testu, vpravo měření délky kořene *A. cepa* (zdroj vlastní foto)

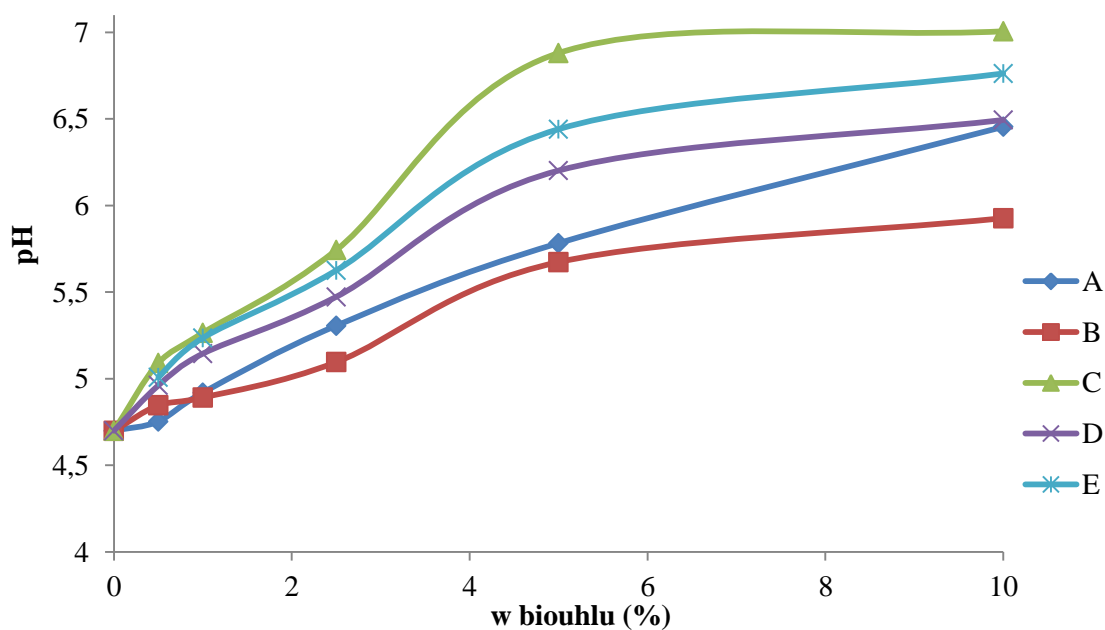
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Testy v kontaktním uspořádání

Tato kapitola zahrnuje přehled výsledků kontaktních testů ekotoxicity pro zhodnocení případných negativních vlivů na organismy terestrického ekosystému po přidavku biouhlu z čistírenských kalů nebo nepyrolyzovaného kalu do půdy. Bylo testováno všech 5 vzorků, přičemž vzorek byl do standardní půdy přidán v takovém množství, aby jeho podíl byl 0,5; 1; 2,5; 5 a 10 % což odpovídá koncentracím 5; 10; 25; 50 a 100 g.kg⁻¹. V další části práce jsou tyto směsi označovány pojmem směsi nebo směsné vzorky.

4.1.1 Stanovení vlastností testovaných matric

V rámci testů se žížalami byly stanoveny hodnoty pH a maximální vodní kapacity u samotné standardní půdy a u všech testovaných směsí půdy a vzorků. Graf 1 zobrazuje závislost pH půdy na obsahu přidaného biouhlu a zároveň porovnává všechny testované směsi. U všech směsí je patrná tendence růstu hodnot pH vzhledem k hodnotě pH samotné standardní půdy, která byla 4,7. Hodnoty pH samotných vzorků A – E jsou uvedeny v Tabulce 4. I když vzorky biouhlu samy o sobě nejsou silně alkalické, měly by v případě aplikace na kyselé půdy při určitých dávkách potenciál zmírnit její nízké hodnoty pH. Naše výsledky jsou v souladu s výsledky studií (18) a (22), kdy bylo rovněž pozorováno zvyšování hodnot pH půdy po aplikaci biouhlu.

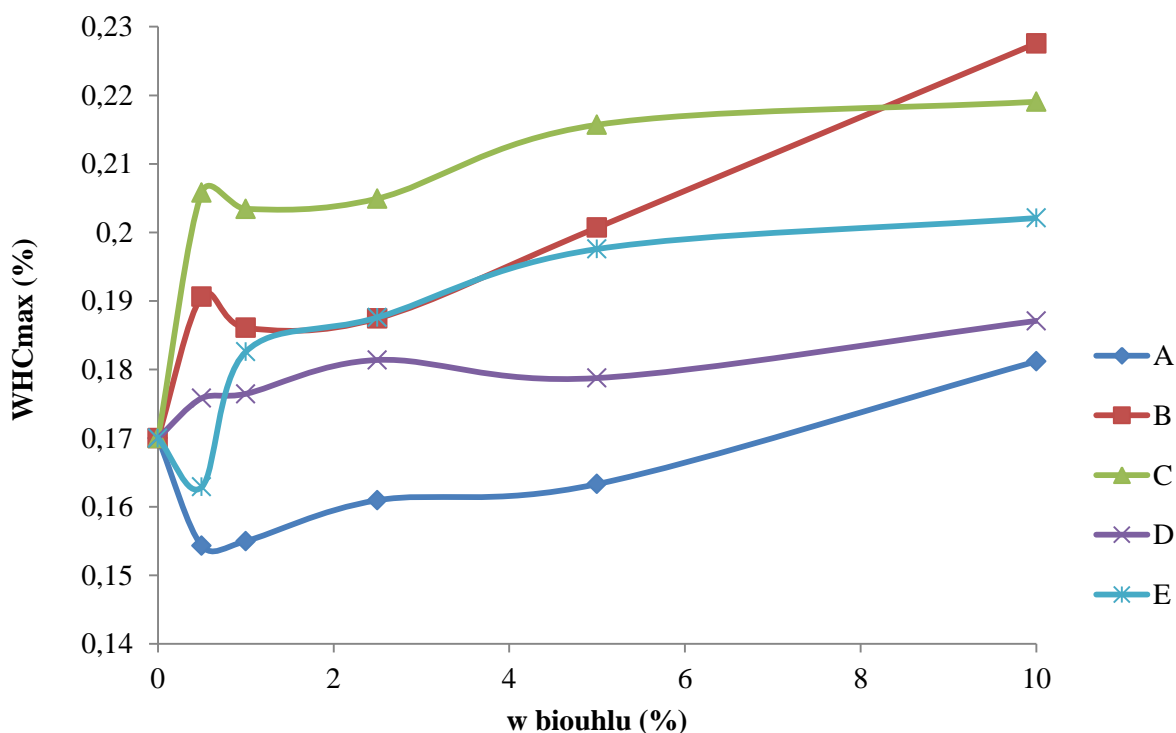


Graf 1 – Závislost pH půdy na přidavku biouhlu

Tabulka 4 – pH vzorků A – E

	A	B	C	D	E
pH	7,406	5,939	7,685	7,135	7,278

V Grafu 2 jsou zobrazeny závislosti hodnot maximální vodní kapacity půdy na přidavku jednotlivých vzorků. Kromě biouhlu A, mají všechny ostatní směsi biouhlu a půdy hodnotu WHC_{max} vyšší oproti původní hodnotě, což znamená, že mají tendenci zadržovat více vody než standardní půda samotná. Tato vlastnost obecně charakterizuje biouhel vyrobený z různých druhů odpadní biomasy, díky velikosti jeho povrchu a pórovitosti. Podle studie (51) záleží na specifických vlastnostech půdy, biouhlu a použité dávce a není zcela možné z dlouhodobého hlediska předpovědět vliv interakce půdy a biouhlu na zadržování vody.



Graf 2 – Závislost WHC_{max} na přidavku biouhlu

4.1.1 Test únikového chování se žížalami *E. fetida*

V tomto testu byl na základě preferencí organismů vyhodnocen přímý vliv testovaných směsí na zástupce půdních bezobratlých. Testováno bylo všech 5 vzorků za přidavku 0,5; 5 a 10 % vzorku do standardní půdy, což odpovídá koncentracím 5; 50 a 100 g.kg⁻¹. Z průměrných hodnot počtu jedinců v kontrolní půdě K a průměrných hodnot počtu jedinců

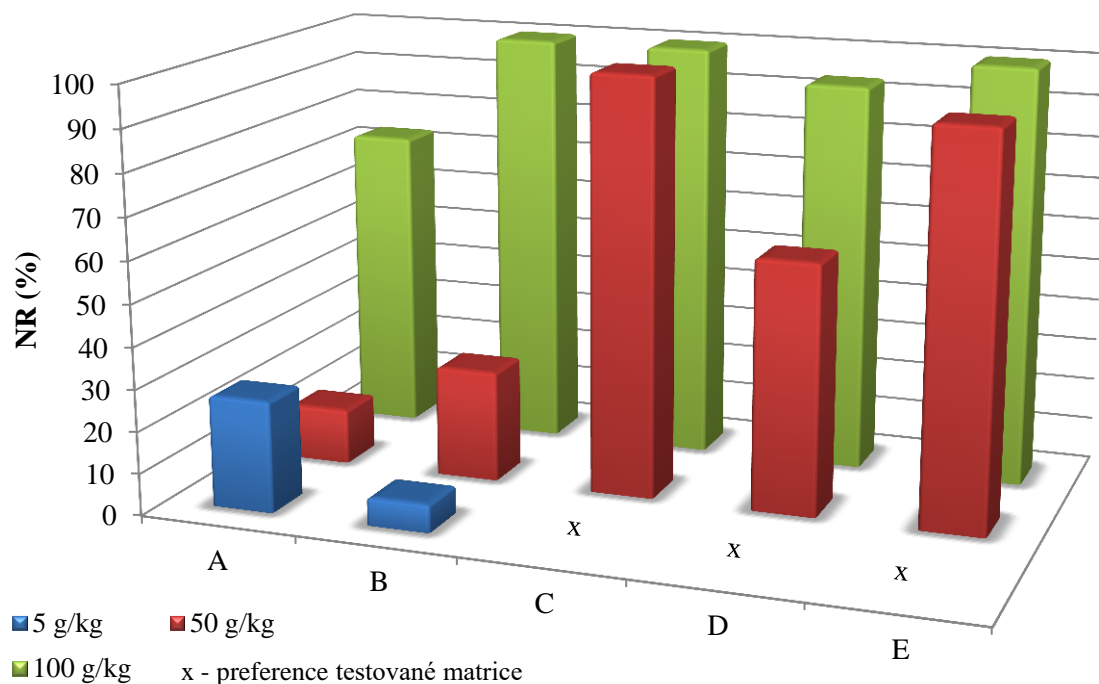
v testované půdě T byla vypočtena míra únikovosti NR, vyjádřena v procentech. Všechny tyto hodnoty jsou pro jednotlivé vzorky shrnuty v Tabulce 5.

Nejvyšší míra únikovosti 100 % byla zaznamenána u vzorku B, C a E v koncentraci 100 g.kg^{-1} a u vzorku C také v koncentraci 50 g.kg^{-1} . Metodika testu označuje matrice, ve kterých je únikovost vyšší než 80 %, za toxické nebo se sníženou kvalitou. Na základě výsledků můžeme takto označit několik testovaných matric. Kromě vzorku A, u kterého únikovost dosáhla hodnoty 73,3 %, což je lehce pod hranicí, to jsou všechny ostatní v koncentraci 100 g.kg^{-1} , která odpovídá dávce 120 t.ha^{-1} . Dva vzorky vykazovaly nadlimitní únikovost i při koncentraci 50 g.kg^{-1} (60 t.ha^{-1}) a to biouhel C a sušený kal E, u kterého byl tento stav vzhledem k běžně používaným dávkám $5 - 10 \text{ t.ha}^{-1}$ předpokládán. Preference testované půdy organismy byla zaznamenána u vzorku C, D a E v koncentraci 5 g.kg^{-1} (6 t.ha^{-1}).

Z výsledků testu lze odhadnout hranice toxicity, které jsou pro biouhel B a D v rozmezí $50 - 100 \text{ g.kg}^{-1}$ a pro biouhel C a sušený kal E $5 - 50 \text{ g.kg}^{-1}$. Míru únikovosti všech testovaných směsí přehledně zobrazuje Graf 3.

Tabulka 5 – Výsledky testů únikového chování organismu E. fetida

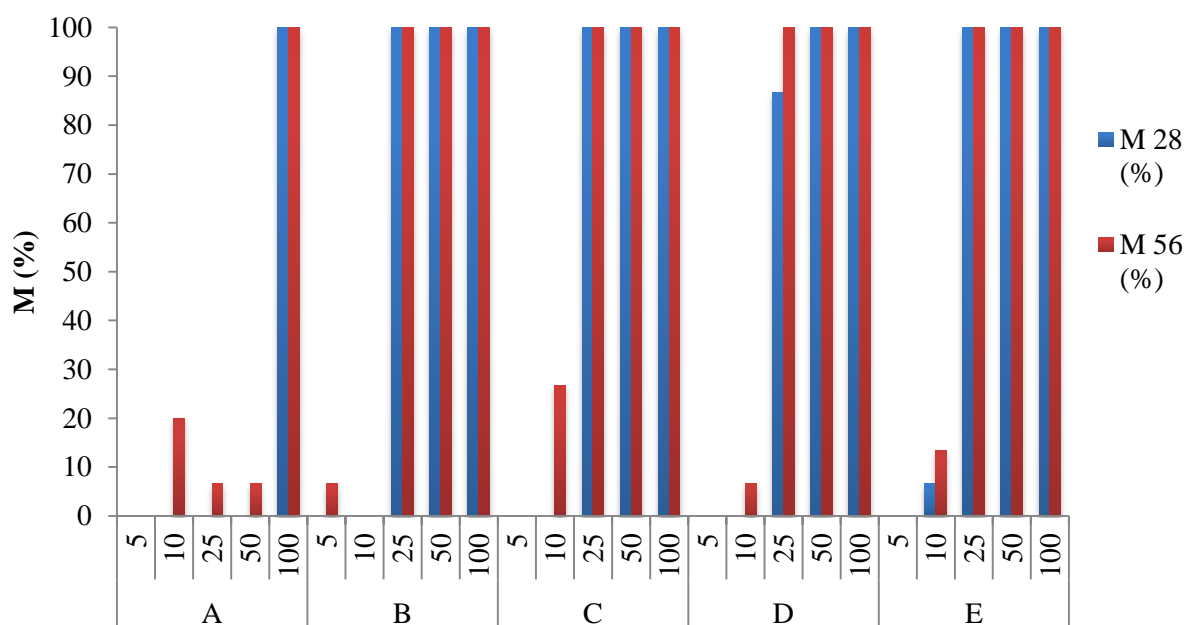
	c (g.kg^{-1})	5	50	100
A	K	6,3	5,7	8,7
	T	3,7	4,3	1,3
	NR (%)	26,7	13,3	73,3
B	K	5,3	6,3	10
	T	4,7	3,7	0
	NR (%)	6,7	26,7	100
C	K	4	10	10
	T	6	0	0
	NR (%)	-20	100	100
D	K	4,7	8	9,7
	T	5,3	2	0,3
	NR (%)	-6,7	60	93,3
E	K	3,7	9,7	10
	T	6,3	0,3	0
	NR (%)	-26,7	93,3	100



Graf 3 – Porovnání míry únikového chování organismu *E. fetida*

4.1.1 Test reprodukce se žížalami *E. fetida*

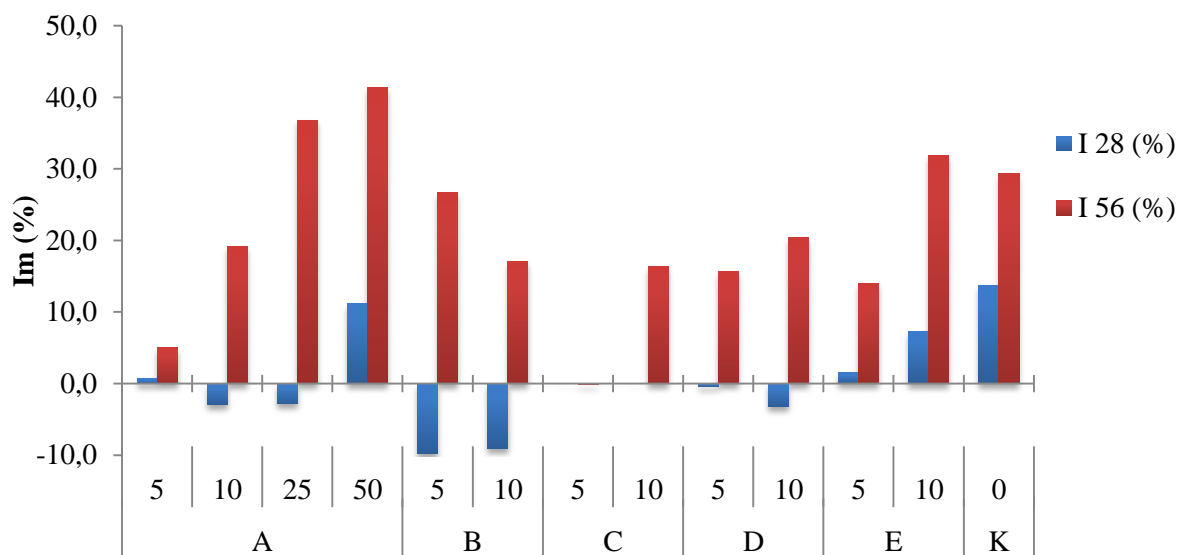
Vedle rychlého únikového testu byl tento půdní organismus použit také do testu semichronického. Během 56 denní expozice organismů vůči testovaným matricím byly kromě mortality sledovány účinky na biomasu a reprodukci žížal. Již několik dní po nasazení testu byla pozorována významná míra mortality organismů, která ovlivnila výsledky celého testu. V Grafu 4 je shrnuta míra mortality organismů po 28 a 56 dnech.



Graf 4 – Mortalita organismů *E. fetida* po 28 a 56 dnech

Úmrtnost 100 % ve všech paralelních stanoveních byla sledována v koncentracích 25; 50 a 100 g.kg⁻¹ u všech testovaných vzorků kromě biouhlu A. Tento vzorek vykazoval nejvyšší míru úmrtnosti jen při koncentraci 100 g.kg⁻¹ a jeho ekotoxikologický účinek se ve srovnání s ostatními vzorky dá označit jako nejnižší.

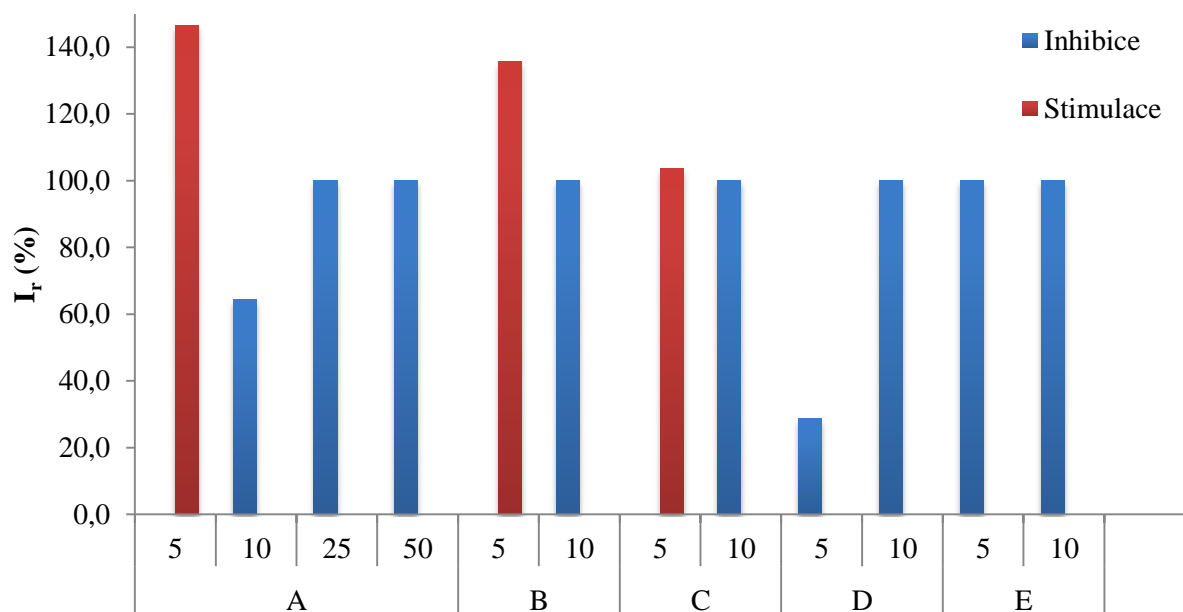
Dalším sledovaným parametrem byl vliv matrice na množství biomasy. V kontrolním stanovení by nemělo docházet k významným úbytkům hmotnosti organismů, naopak hmotnost organismů by se měla přirozeně zvyšovat. Navzdory pravidelnému přísunu potravy v doporučeném týdenním množství 2,5 g mletého koňského hnoje na krabičku s pěti žížalami, průměrný úbytek hmotnosti na žížalu činil po 28 dnech 77 mg a po 56 dnech dokonce 166 mg. Z tohoto důvodu nebyla vypočtena inhibice hmotnosti ve vztahu ke kontrole, ale k počáteční hmotnosti.



Graf 5 – Míra inhibice hmotnosti organismu *E. fetida* po 28 a 56 dnech

Graf 5 zobrazuje míru inhibice hmotnosti přeživších organismů. Nejvyšší míra inhibice hmotnosti organismů byla sledována u vzorku A při koncentraci 25 g.kg⁻¹ a 50 g.kg⁻¹, a to 36,8 a 41,3 %. Záporné hodnoty I28 naznačují, že v některých matricích organismy během prvních 28 dní oproti druhému období testu prospívaly. Souhrn všech výsledků pro přeživší organismy je obsažen v Tabulce 6.

Posledním sledovaným parametrem je vliv testované matrice na reprodukci, který byl stanoven oproti kontrole. Testované matrice, které projevily stimulaci reprodukce vůči kontrole, byly vzorky biouhlu A, B, C v koncentraci 5 g.kg⁻¹. Dalšími matricemi, ve kterých byla pozorována alespoň nějaká reprodukce i když nižší než v kontrole byly vzorek biouhlu A v koncentraci 10 g.kg⁻¹ a vzorek D v koncentraci 5 g.kg⁻¹. Přehled míry inhibice reprodukce žížal zobrazuje Graf 6.



Graf 6 - Inhibice reprodukce *E. fetida*

Tabulka 6 – Souhrn výsledků testu reprodukce *E. fetida* pro přeživší organismy

Vzorek	c (g.kg ⁻¹)	I ₂₈ (%)	I ₅₆ (%)	V	J	V/N	J/N	J/V	I _r (%)
A	5	0,7	5,1	12	23	2,4	4,6	1,9	Stimulace
	10	-2,9	19,2	11	3,3	2,2	0,7	0,3	64,3
	25	-2,8	36,8	6	0	1,2	0	0	100
	50	11,2	41,3	3,7	0	0,7	0	0	100
B	5	-9,8	26,7	19	22	3,8	4,4	1,2	Stimulace
	10	-9,1	17,1	11	0	2,2	0	0	100
C	5	0,0	-0,2	19,7	19	3,9	3,8	1,0	Stimulace
	10	0,0	16,4	6,7	0	1,3	0	0	100
D	5	-0,4	15,6	10	6,7	2	1,3	0,7	28,6
	10	-3,2	20,3	14	0	2,8	0	0	100
E	5	1,5	14,0	16	0	3,2	0	0	100
	10	7,2	31,8	2,7	0	0,6	0	0	100
Kontrola	0	13,7	29,4	10	9,3	2	1,9	0,9	

I – Inhibice hmotnosti, V – průměrný počet kokonů, J – průměrný počet juvenilů, N – průměrný počet přeživších žížal, I_r – Inhibice reprodukce

Tabulka s veškerými výsledky testu je obsažena v Příloze 1. Tento test nelze označit jako validní, mortalita dospělých žížal v kontrole byla sice nižší než 10 %, ale nebyla splněna podmínka pro počet vyprodukovaných nedospělých jedinců v kontrole. Limitem je minimální počet tří juvenilů na jednoho dospělého, ale v tomto testu bylo dosaženo pouze dvou juvenilů na dospělého jedince. Standardní půda Lufa 2.2 má obvykle dobrou odezvu na tyto organismy, příčinou problému by mohly být nevhodné laboratorní podmínky nebo často se měnící vlhkost půdy. I když budeme výsledky tohoto testu považovat za orientační, míra mortality a inhibice hmotnosti i reprodukce organismů je více než překvapivá. Na základě výsledků můžeme označit u všech vzorků biouhlu koncentraci 5 g.kg⁻¹ za netoxickou. Tato koncentrace odpovídá dávce 6 t.ha⁻¹, což je dávka v předpokládaném rozmezí použití. Naopak nepyrolyzovaný sušený kal se projevil i v této nejnižší (běžně používané) dávce negativně. Testovací organismy sice inkubaci přežily, ale projevilo se to na nich výrazným snížením hmotnosti a úplnou absencí juvenilních jedinců po 56 denní inkubaci.

4.1.2 Test stanovení inhibice růstu kořene salátu setého *L. sativa*

Inhibice růstu kořene této terestrické rostliny byla stanovena na základě rozdílů průměrných délek kořenů \bar{L} v testovaných matricích a kontrole. Všechny testované matrice vykazují na růst kořene salátu inhibiční efekt. Nejvyšší míru inhibice 100 % vykazuje vzorek D a E v koncentraci 100 g.kg⁻¹, nejnižší opět vzorek D v koncentraci 5 g.kg⁻¹ a to 7,8 %.

Na základě výsledků, které jsou shrnuty v Tabulce 7, byla pro každý vzorek pomocí programu Microsoft Excel a lineární regrese vypočtena hodnota 120hIC₅₀.

Tabulka 7 – Výsledky testu inhibice růstu kořene organismus *L. sativa*

	c (g.kg ⁻¹)	0	5	10	25	50	100	IC ₅₀ (g.kg ⁻¹)
A	\bar{L} (mm)	16	12,5	10,9	8,4	8,1	5,8	39,0
	I (%)	-	21,9	32,3	47,4	49,4	63,6	
B	\bar{L} (mm)	16	10,0	9,2	8,3	8,1	1,2	17,5
	I (%)	-	37,4	42,8	47,9	49,3	92,6	
C	\bar{L} (mm)	16	12,4	10,8	11,6	9,0	5,4	56,7
	I (%)	-	22,4	32,8	27,5	43,9	66,1	
D	\bar{L} (mm)	16	14,8	13,2	13,8	10,8	0,0	42,2
	I (%)	-	7,8	17,4	13,9	32,6	100	
E	\bar{L} (mm)	16	11,9	12,1	3,7	0,3	0,0	13,8
	I (%)	-	25,8	24,2	76,8	98,2	100	

Jako vzorek s největším ekotoxickým účinkem se jeví sušený čistírenský kal E s hodnotou IC_{50} $13,8 \text{ g.kg}^{-1}$, která odpovídá dávce zhruba $16,6 \text{ t.ha}^{-1}$. Hodnota IC_{50} vzorku D byla vypočtena na $42,2 \text{ g.kg}^{-1}$. Srovnáme-li výsledky čistírenského kalu E a vzorku biouhlu D, jakožto produktu pyrolýzy tohoto sušeného kalu, je patrné, že hodnota IC_{50} téměř třikrát vzrostla. Tímto se utvrzuje předpoklad snížení ekotoxických účinků čistírenských kalů po jejich termickém zpracování.

Nejvyšší hodnotu IC_{50} a tedy nejnižší ekotoxický účinek vykazuje vzorek C $56,7 \text{ g.kg}^{-1}$ a naopak největší ekotoxický účinek vzorek B, kde hodnota IC_{50} byla $17,5 \text{ g.kg}^{-1}$. Tato hodnota je srovnatelná spíše s výsledky získanými pro čistírenský kal než pro ostatní biouhly a je způsobena vysokou mírou inhibice růstu kořene již v nízkých koncentracích.

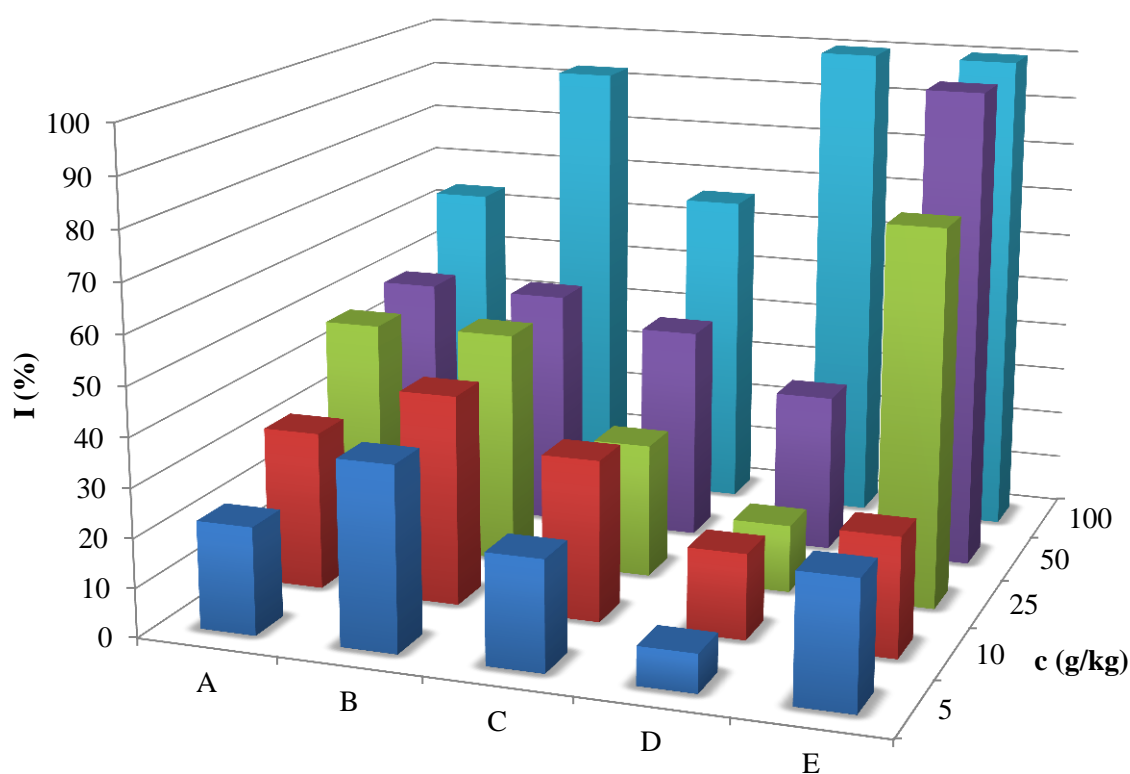
Biouhel i kaly z ČOV jsou z legislativního hlediska posuzovány jako odpad a vztahuje se na ně vyhláška č. 94/2016 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, která posuzuje ekotoxicitu jako nebezpečnou vlastnost HP14. Jedním z testovacích organismů je i *L. sativa*. Odpad je považován za ekotoxický v případě, že 10% koncentrace (100 g.kg^{-1}) testované matrice vykazuje ve srovnání s kontrolou vyšší inhibici nebo stimulaci, než je limitní hodnota – 30 % (43). V této koncentraci byla u všech testovaných vzorků pozorována 2 až 3x vyšší inhibice než limitní, což je řadí mezi odpady s nebezpečnou vlastností HP 14 Ekotoxický.

Veškeré výsledky testů byly dále využity pro statistické zpracování prostřednictvím Dunnettova testu, pomocí kterého byla určena statistická významnost odlišnosti zjištěných délek kořínků ve všech maticích oproti kontrole. Na základě této statistické analýzy byla u většiny matic prokázána významná odlišnost od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a tím byl rovněž prokázán ekotoxický účinek. Tabulka 8 zobrazuje výsledky Dunnettova testu pro matrice, u kterých se míra inhibice vůči kontrole pohybovala pod 40 %.

Vzorek A a C v koncentraci 5 g.kg^{-1} , vzorek D v koncentracích 5; 10 a 25 g.kg^{-1} a také sušený kal E v koncentraci 10 g.kg^{-1} sice působily na růst kořene salátu inhibičně, ale odlišnost od kontroly není statisticky významná na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, což znamená, že tyto matrice lze označit za ekotoxikologicky negativní. Ve všech těchto případech míra inhibice nepřekročila hranici 25 %. Přehled míry inhibice růstu kořene salátu vůči kontrole pro všechny testované matrice jsou zobrazeny v Grafu 7.

Tabulka 8 – Výsledky Dunnettova testu pro organismus *L. sativa*

		\bar{L} (mm)	$\bar{L}_k - \bar{L}$ (mm)	SE	SD (mm)	I (%)	Významná odlišnost na hladině $\alpha = 0,05$
A	5	12,5	3,5	1,79	4,31	21,9	NE
	10	10,9	5,1	1,6	3,86	32,3	ANO
B	5	10	6	1,81	4,37	37,4	ANO
C	5	12,4	3,6	1,96	4,73	22,4	NE
D	5	14,8	1,2	1,93	4,64	7,8	NE
	10	13,2	2,8	1,91	4,59	17,4	NE
	25	13,8	2,2	1,79	4,3	13,9	NE
	50	10,8	5,2	1,74	4,19	32,6	ANO
E	5	11,9	4,1	1,62	3,89	25,8	ANO
	10	12,1	3,9	1,81	4,36	24,2	NE



Graf 7 – Porovnání inhibičního efektu na růst kořene *L. sativa*

4.2 Testy v akvatickém uspořádání

Předmětem následujících kapitol jsou výsledky a diskuze k testům v akvatickém uspořádání na vodních organismech *D. magna* a *A. salina* a terestrických organismech *S. alba* a *A. cepa*. Testy slouží k hodnocení ekotoxicity vodných výluhů zkoumaných materiálů a posouzení míry vyluhovatelnosti látek obsažených v materiálu a jejich případných vlivů na testovací organismy. U všech použitých organismů byly provedeny pouze předběžné testy se stejnou koncentrační řadou 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 %, která odpovídá koncentraci 62,5; 125; 250; 500 a 1 000 ml.l⁻¹.

4.2.1 Vodné výluhy

Pro potřebu testů v akvatickém uspořádání byly připraveny vodné výluhy všech vzorků biouhlu a vzorku nepyrolyzovaného čistírenského kalu podle metodiky viz kapitola 3.3.1. Jeden ze vzorků biouhlu, biouhel D, byl použit pro přípravu tří výluhů. Poprvé byl použit biouhel v původní zrnitosti (výluh D), druhý výluh byl připraven z mletého vzorku biouhlu D (výluh D_M) a jako poslední byl připraven tzv. kyselý výluh použitím roztoku zředěné kyseliny sírové o pH = 5,011 (výluh D_K). Po filtraci byla u všech připravených výluhů změřena hodnota pH a konduktivita. Přehled těchto hodnot zobrazuje Tabulka 9.

Tabulka 9 – Základní fyzikálně chemické charakteristiky výluhů testovaných vzorků

	A	B	C	D	D _M	D _K	E
pH	7,383	6,725	9,010	7,626	7,385	7,648	7,792
κ (μS.cm ⁻¹)	392	806	1 130	1 672	2 003	1 949	3 440

Všechny výluhy biouhlu byly značně zabarvené do hněda až žluta a zapáchaly po popelu. Nejnižší konduktivitu vykazoval výluh A, což znamená nižší přestup iontů a látek ze vzorku do výluhu než vykazovaly ostatní biouhly. Při porovnání tří výluhů biouhlu D je patrné, že při jeho rozemletí či vyluhování v kyselém prostředí se zvýší konduktivita přibližně o 15 %. V porovnání výluhů D, D_M a D_K s výluhem kalu E bylo pozorováno mírné snížení konduktivity, pravděpodobně důsledkem pyrolýzy. Nejvyšší pH měl výluh C, ale jak již bylo zmíněno dříve, na hodnotu pH má vliv hned několik faktorů.

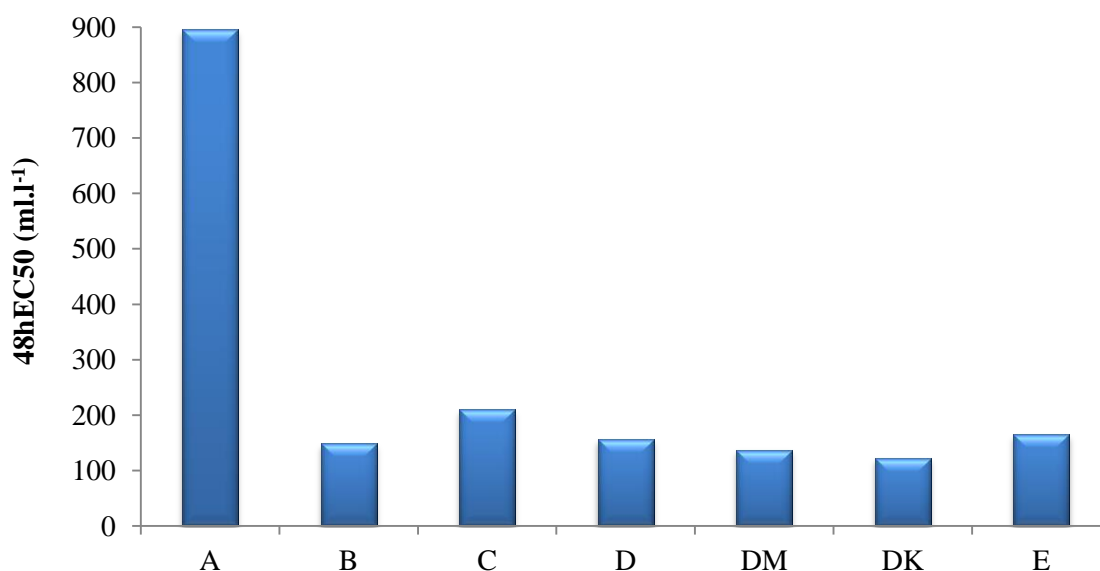
4.2.2 Test akutní toxicity na perloočkách *D. magna*

Prostřednictvím akutního testu toxicity byl sledován vliv připravených výluhů na imobilizaci organismu *D. magna* po 24 a 48 hodinách. V době testování byl pro organismus *D. magna* v laboratoři proveden také test s referenční látkou K₂Cr₂O₇.

Hodnota 24hEC50 byla stanovena na 1,28 mg.l⁻¹ a hodnota 48hEC50 na 0,773 mg.l⁻¹. Výsledky tohoto testu splňovaly podmínky pro validitu a dostatečnou citlivost testovacích organismů.

Z výsledků testu byla vypočtena procentuální imobilizace/mortalita v každé koncentraci u všech testovaných výluhů, která byla následně vyhodnocena prostřednictvím probitové analýzy. K hodnotám procentuální imobilizace byly přiřazeny příslušné probitové hodnoty. Výsledná hodnota 24hEC50 a 48hEC50 pro jednotlivé výluhy byla vypočtena na základě rovnice lineární regrese, která vznikla vynesemím příslušných probitových hodnot v závislosti na koncentraci v logaritmickém měřítku pomocí programu Microsoft Excel. Výsledky testu jsou shrnuty v Tabulce 10.

Z připravených výluhů se jako nejméně toxický projevil vzorek biouhlu A. Hodnota EC50 po 48 hodinové expozici byla vypočtena na 896 ml.l⁻¹ a hodnotu 24hEC50 nebylo možné určit, protože nebylo dosaženo 50 % imobilizace testovacích organismů. Všechny ostatní výluhy vykazovaly velmi podobnou míru toxicity. Hodnoty 48hEC50 porovnává Graf 8. Na rozdíl od výsledků ostatních testů se výluh z nepyrolyzovaného kalu E jevil jako méně toxický než jeho pyrolyzovaná forma – biouhel D, i když rozdíly byly nepatrné. Tento překvapivý jev byl na organismu *D. magna* pozorován také polskými vědci ve studii (35).

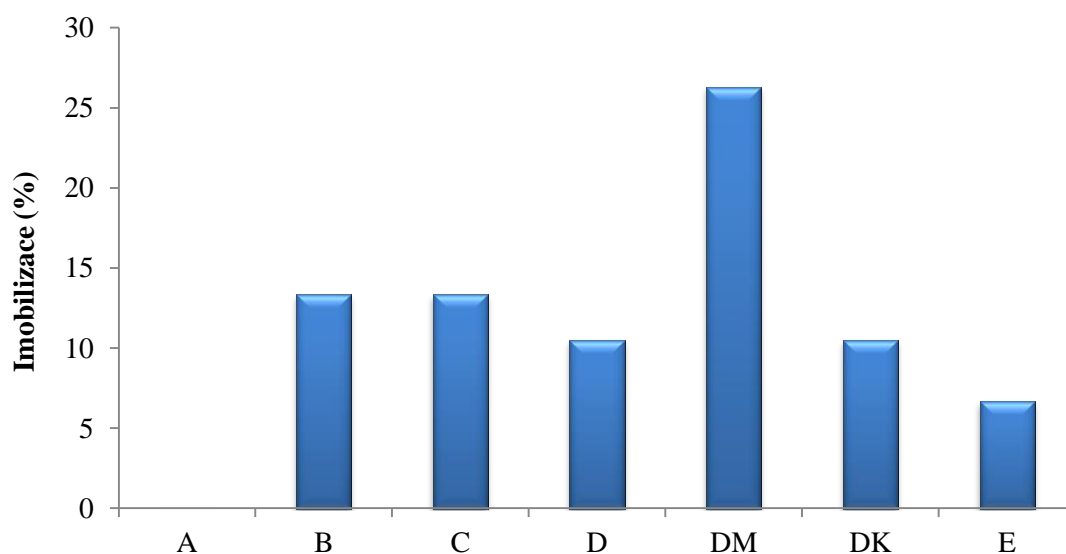


Graf 8 – Porovnání hodnot 48hEC50 pro organismus *D. magna*

Tabulka 10 – Výsledky testu s organismem *D. magna*

c (ml.l ⁻¹)			0	62,5	125	250	500	1000	EC50 (ml.l ⁻¹)	
									24	48
A	Vitální organismy	24	5	5	5	5	5	3,3	-	896
		48	5	5	5	5	4,7	2,3		
	Imobilizace (%)	24	-	0	0	0	0	33,3		
		48	-	0	0	0	6,7	53,3		
B	Vitální organismy	24	5	5	4,3	0	0	0	149	149
		48	5	5	4,3	0	0	0		
	Imobilizace (%)	24	-	0	13,3	100	100	100		
		48	-	0	13,3	100	100	100		
C	Vitální organismy	24	5	5	4,3	2	0	0	213	210
		48	5	5	4,3	1,7	0	0		
	Imobilizace (%)	24	-	0	13,3	60	100	100		
		48	-	0	13,3	66,7	100	100		
D	Vitální organismy	24	5	4,75	4,5	1	0	0	159	157
		48	4,75	4,5	4,25	0,75	0	0		
	Imobilizace (%)	24	-	5	10	80	100	100		
		48	-	5,3	10,5	84,2	100	100		
D_M	Vitální organismy	24	5	5	4,25	0,25	0	0	192	137
		48	4,75	4,5	3,5	0,25	0	0		
	Imobilizace (%)	24	-	0	15	95	100	100		
		48	-	5,3	26,3	94,7	100	100		
D_K	Vitální organismy	24	5	4,75	4,25	0	0	0	120	123
		48	4,75	4,5	4,25	0	0	0		
	Imobilizace (%)	24	-	5	15	100	100	100		
		48	-	5,3	10,5	100	100	100		
E	Vitální organismy	24	5	4,3	4,7	3,6	0	0	180	165
		48	5	4,3	4,7	2,3	0	0		
	Imobilizace (%)	24	-	13,3	6,7	26,7	100	100		
		48	-	13,3	6,7	53,3	100	100		

Tento test patří do skupiny testů pro hodnocení ekotoxicity odpadů dle Vyhlášky č. 94/2016 Sb. Vyhláška ustanovuje limitní hodnotu 48hEC50 pro hodnocení odpadu jako nebezpečný s nebezpečnou vlastností HP14 Ekotoxický na $\leq 10 \text{ ml.l}^{-1}$. Jak je z výsledků patrné, žádný výluh nevykazoval dle výše uvedených kritérií ekotoxicitu. Dalším možným kritériem vyhlášky je, že procento imobilizace dafní nesmí přesáhnout 20 % u výluhu zředěného na koncentraci 100 ml.l^{-1} po 48 hodinách expozice. Toto ředění sice nebylo testováno, vezmeme-li v úvahu nejbližší vyšší koncentraci, tedy 125 ml.l^{-1} , byla tato podmínka splněna u všech výluhů kromě výluhu D_M, viz Graf 9.



Graf 9 – Porovnání imobilizace organismů v koncentraci 125 ml.l^{-1}

4.2.1 Test akutní toxicity na žábronožkách *A. salina*

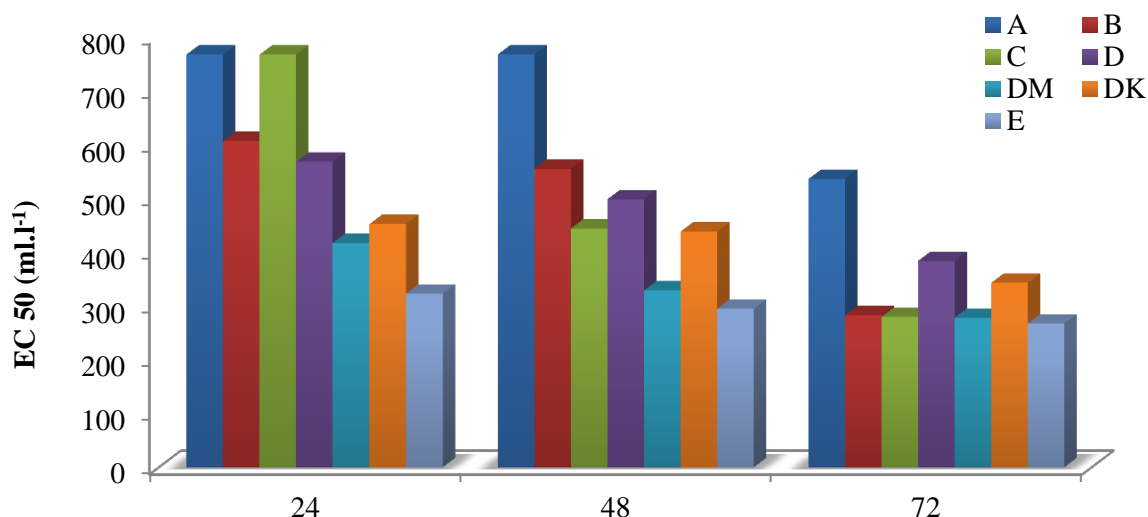
Druhým vodním organismem, u kterého byl sledován vliv připravených výluhů na imobilizaci/mortalitu byly žábronožky *A. salina*. Odečítání výsledků probíhalo vždy po 24, 48 a 72 hodinách. Výsledky byly zpracovány obdobným způsobem jako u akutního imobilizačního testu na perloočkách, tedy probitovou analýzou a následným výpočtem z regresní rovnice v programu Microsoft Excel. Míra imobilizace vůči kontrole a výsledné hodnoty EC 50 jsou shrnuty v Tabulce 7.

Obdobně jako u testu s *D. magna* se z připravených výluhů jako nejméně toxický projevil vzorek biouhlu A. Hodnota EC50 po expozici 24 i 48 hodin byla vypočtena na 767 ml.l^{-1} a pro 72 hodinách klesla na 536 ml.l^{-1} . Tento trend byl pozorován u všech testovaných výluhů, hodnotu 72hEC50 je proto třeba brát s rezervou. Není jisté, zdali organismy umíraly na následky expozice toxických látek nebo z nedostatku potravy, protože literatura udává možnost právě na těchto organismech testovat letalitu i po třech dnech neboť energetické rezervy organismu by měly za podmínek testu vydržet až pět dnů (32).

Tabulka 11 - Výsledky testu na organismu *A. salina*

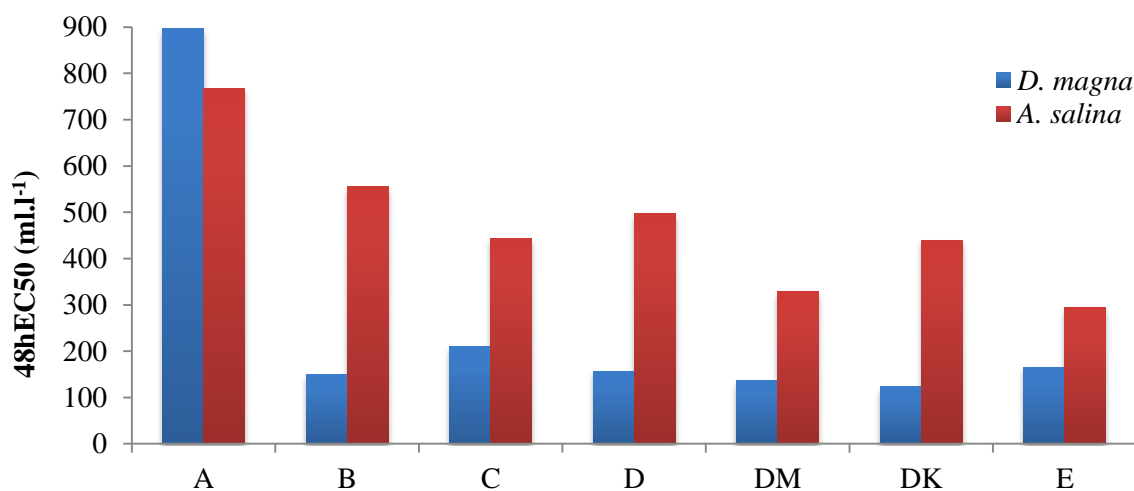
c (ml/l)			62,5	125	250	500	1000	EC50 (ml.l ⁻¹)		
								24	48	72
A	Imobilizace (%)	24	0	0	0	0	100	767	776	536
		48	0	0	0	0	100			
		72	0	0	2,6	2,6	100			
B	Imobilizace (%)	24	0	0	0	6,7	100	606	555	283
		48	0	0	0	53,3	100			
		72	0	0	40	100	100			
C	Imobilizace (%)	24	0	0	0	0	100	767	444	280
		48	0	6,7	6,7	33,3	100			
		72	3,3	16,7	10	53,3	100			
D	Imobilizace (%)	24	2,5	0	0	37,5	100	568	498	384
		48	0	2,6	0	97,4	100			
		72	-76,2	-76,2	-71,4	100	100			
D_M	Imobilizace (%)	24	0	0	7,5	80	100	417	329	278
		48	0	2,5	17,5	85	100			
		72	0	2,5	20	100	100			
D_K	Imobilizace (%)	24	0	0	2,5	55	100	452	438	343
		48	0	0	5	62,5	100			
		72	0	2,5	5	87,5	100			
E	Imobilizace (%)	24	2,5	0	40	86,7	100	323	295	267
		48	0	2,6	38,5	96,6	100			
		72	0	2,6	40,4	100	100			

Největší toxický efekt byl pozorován u výluhu nepyrolyzovaného kalu E, kde hodnota 24hEC50 (48hEC50) byla 323 (267) ml.l⁻¹. Srovnáme-li toxicitu výluhů biouhlu D připraveného z tohoto kalu, můžeme říci, že díky pyrolýze byla toxicita částečně snížena. Porovnání hodnot EC50 v závislosti na době expozice je zobrazeno v Grafu 10.



Graf 10 - Porovnání hodnot EC50 při expozici 24, 48 a 72 hodin

Citlivost obou vodních organismů *D. magna* a *A. salina* byla porovnána u všech výluhů na základě hodnot 48hEC50. Z grafu 11 je patrné, že organismus *D. magna* je vůči testovaným výluhům citlivější, čímž byl potvrzen předpoklad. *A. salina* jakožto slaništní organismus je často používána pro testy toxicity v prostředí s vysokou mineralizací právě místo organismu *D. magna*, jejíž citlivost je v takovémto prostředí značně snížena (52).



Graf 11 - Porovnání hodnot 48hEC50 pro organismus *D. magna* a *A. salina*

4.2.1 Test inhibice růstu kořene hořčice bílé *S. alba*

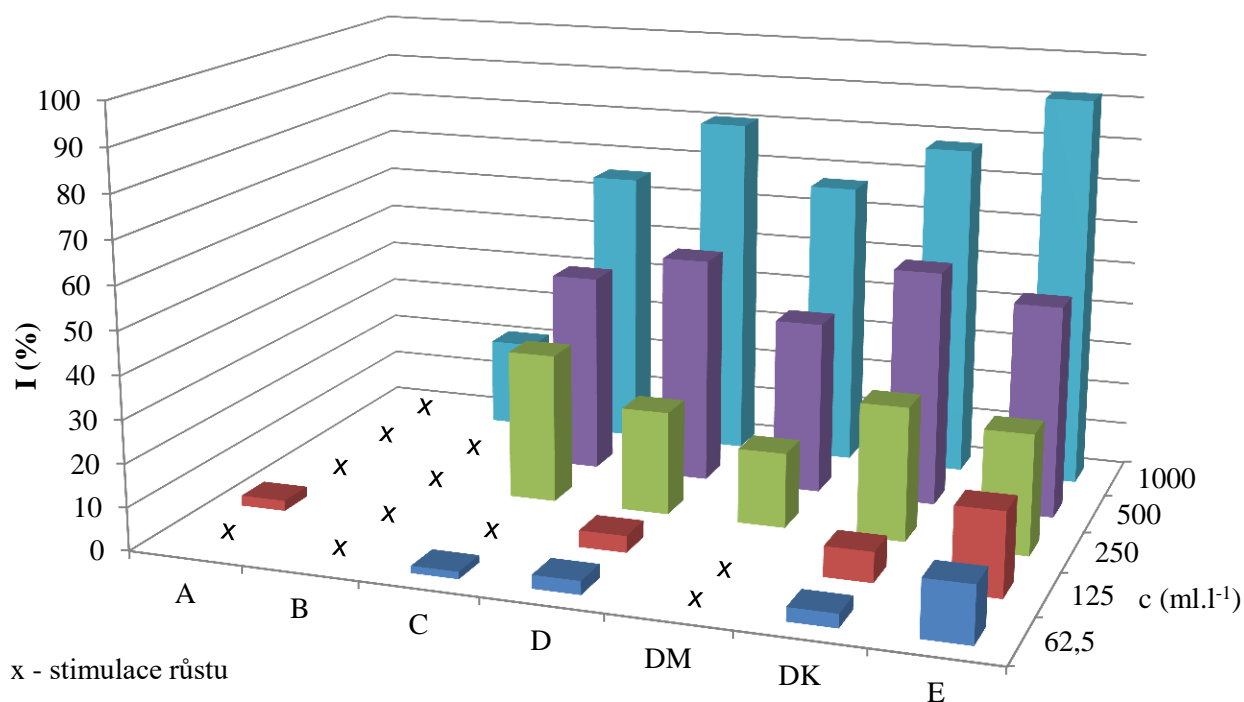
Prostřednictvím tohoto testu byla hodnocena ekotoxicita výluhů připravených z jednotlivých vzorků biouhlu a sušeného kalu E na základě výpočtu míry inhibice růstu kořene v jednotlivých nasazeních oproti kontrole po 72 hodinách expozice. Z těchto hodnot byly dále pomocí lineární regrese v programu Microsoft Excel vypočteny hodnoty 72hIC50 pro jednotlivé výluhy testovaných vzorků. Přehled výsledků testu je uveden v Tabulce 12.

Tabulka 12 - Výsledky testu na organismu *S. alba*

c (ml.l ⁻¹)		0	62,5	125	250	500	1000	IC50 (ml.l ⁻¹)
A	\bar{L} (mm)	24,8	25,0	24,2	26,1	26,7	26,3	-
	I (%)	-	-0,6	2,4	-5,0	-7,7	-6,0	
B	\bar{L} (mm)	26,7	29,6	32,9	30,3	29,8	21,1	-
	I (%)	-	-10,9	-23,3	-13,3	-11,7	21,0	
C	\bar{L} (mm)	26,7	26,3	28,5	17,4	14,2	9,2	570
	I (%)	-	1,7	-6,6	35,0	46,8	65,5	
D	\bar{L} (mm)	26,1	25,3	25,1	19,8	12,2	5,0	444
	I (%)	-	3,1	3,9	24,2	53,3	80,8	
D _M	\bar{L} (mm)	26,1	27,0	26,3	21,5	15,5	8,6	630
	I (%)	-	-3,6	-0,9	17,5	40,5	67,1	
D _K	\bar{L} (mm)	26,1	25,3	24,3	18,0	11,7	5,7	424
	I (%)	-	3,2	7,0	31,1	55,0	78,2	
E	\bar{L} (mm)	24,8	21,6	20,0	17,9	12,5	2,1	358
	I (%)	-	13,0	19,4	27,9	49,5	91,7	

Pro rostlinu *S. alba* se jako nejméně toxické jeví výluhy vzorků biouhlu A a B, u nichž nebylo možné vypočítat hodnotu IC50, jelikož ani v neřaděném výluhu nebylo dosaženo 50 % inhibice vůči kontrole. Projevila se naopak stimulace růstu kořene oproti kontrole, a to téměř u všech testovaných koncentrací těchto dvou vzorků biouhlu. Jako nejvíce toxický se opět projevil výluh vzorku sušeného kalu E, jehož IC50 byla stanovena na 358 ml.l⁻¹.

Tento test patří také do skupiny testů pro hodnocení ekotoxicity odpadů dle Vyhlášky č. 94/2016 Sb. Vyhláška ustanovuje limitní hodnotu 72hIC50 ≤ 10 ml/l. U všech testovaných výluhů vzorků biouhlu i nepyrolyzovaného kalu E byla vypočtená hodnota 72hIC50 mnohonásobně vyšší. Dle požadavků této vyhlášky nelze vzorky na podkladě testů na tomto organismu považovat za ekotoxické. Porovnání míry inhibice růstu testovaných koncentrací oproti kontrole viz Graf 12.



Graf 12 - Inhibice růstu kořene *S. alba*

Za účelem posouzení statisticky významné odlišnosti zjištěných délek kořínků vůči kontrolám byl proveden Dunnettův test u všech neřaděných výluhů. Na základě této statistické analýzy byla u některých neřaděných vzorků prokázána významná odlišnost od kontroly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a tím byl prokázán ekotoxický účinek. Pouze u výluhů vzorku biouhlu A a B ekotoxický účinek neřaděného výluhu dokázán nebyl. Tabulka 13 zobrazuje výsledky Dunnettova testu pro neřaděné výluhy.

Tabulka 13 - Dunnettův test pro výsledky neřaděných výluhů u organismu *S. alba*

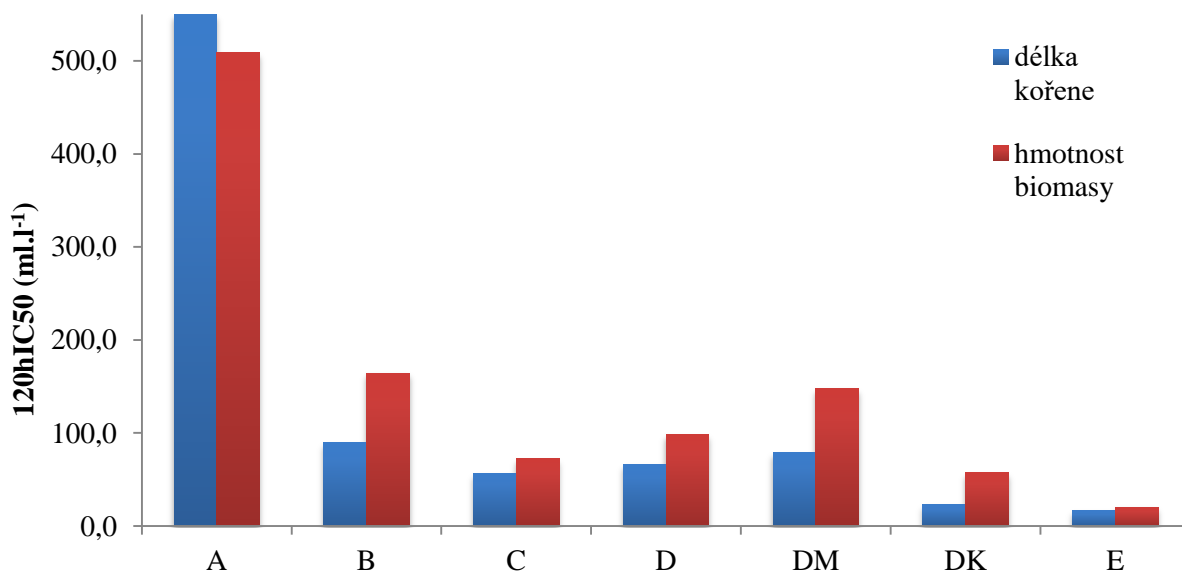
	\bar{L} (mm)	$\bar{L}_k - \bar{L}$ (mm)	SE	SD (mm)	I (%)	Významná odlišnost na hladině $\alpha = 0,05$
A	26,3	-1,4	5,64	14,15	-6,0	NE
B	20,9	5,8	4,34	10,90	21,0	NE
C	9,2	17,5	2,08	5,21	65,5	ANO
D	5,0	21,1	1,14	2,86	80,8	ANO
D_M	8,6	17,5	1,92	4,82	67,1	ANO
D_K	5,7	20,4	1,44	3,60	78,2	ANO
E	2,07	22,8	0,78	1,96	91,7	ANO

4.2.1 Test inhibice růstu kořene cibule *A. cepa*

Posledním testem v akvatickém uspořádání byl test inhibice růstu kořene cibule kuchyňské *A. cepa*. Míra inhibice byla stanovena na základě měření délky kořínků a také podle hmotnosti biomasy kořínků oproti kontrole. Z těchto hodnot byly následně pomocí lineární regrese v programu Microsoft Excel vypočteny výsledné hodnoty 120hIC50 pro jednotlivé výluhy testovaných vzorků. Přehled veškerých dílčích výsledků testu je uveden v Příloze 2.

Kromě výluhu biouhlu A, který v koncentraci 62,5 ml.l⁻¹ vykazoval 5,2% stimulaci růstu kořene, ostatní výluhy ve všech testovaných koncentracích vykazovaly vůči kontrolám inhibici. Výluh biouhlu A se projevil jako nejméně toxický, jeho hodnota 120hIC50 byla vypočtena na 549 ml.l⁻¹. Nejvyšší toxicita se opět ukázala u výluhu vzorku nepyrolyzovaného kalu E, kde již v koncentraci 62,5 ml.l⁻¹ byla pozorována 80,6% inhibice růstu kořene. Hodnota 120hIC50 byla u tohoto výluhu vypočtena na 16,4 ml.l⁻¹.

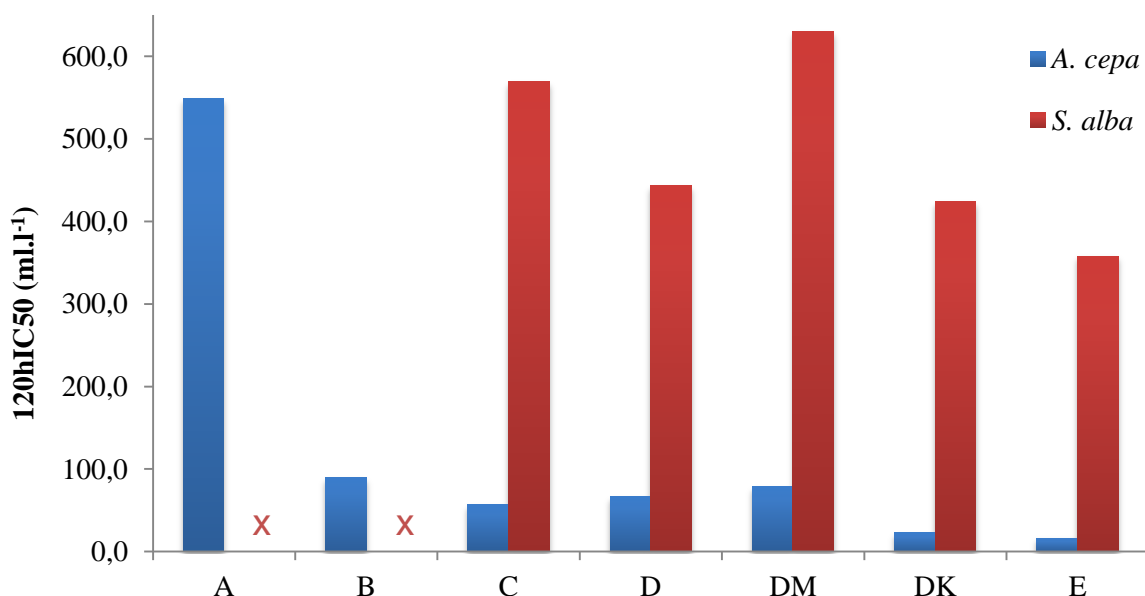
Test byl vyhodnocen také na základě hmotnosti biomasy, byla vypočtena inhibice nárůstu biomasy a následně spočítány hodnoty 120hIC50. Při porovnání hodnot 120hIC50 vypočtených na základě hodnocení dvou různých endpointů lze mezi nimi pozorovat mírný rozdíl, avšak v celkovém porovnání ekotoxicity jednotlivých testovaných matric spolu hodnoty víceméně souhlasí. V Grafu 13 je toto porovnání zobrazeno.



Graf 13 - Porovnání hodnot 120hIC50 na základě inhibice délky kořene a hmotnosti biomasy

Porovnání obou zástupců terestrických rostlin použitých v testech v akvatickém uspořádání, *S. alba* a *A. cepa*, je znázorněno Grafem 14. Organismus *A. cepa* se projevil jako značně citlivější vůči testovaným výluhům. Příkladem je výluh biouhlu B: zatímco u organismu *S. alba* nebyl prokázán ekotoxický účinek ani u neředěného výluhu,

pro organismus *A. cepa* byla stanovena hodnota 120hIC₅₀ 89,5 ml.l⁻¹ což představuje více než 10násobné ředění testovaného výluhu. Toto porovnání ovšem dokazuje variabilitu citlivosti organismů a také potvrzuje nezbytnost využití více zástupců z jednotlivých trofických úrovní a skupin organismů při objektivním hodnocení ekotoxicity materiálu.



Graf 14 - Porovnání hodnot 120hIC₅₀ u rostlin *A. cepa* a *S. alba*

4.3 Souhrnná diskuze výsledků

Pro ekotoxikologické posouzení biocharu z čistírenských kalů byla zvolena baterie testů, která zahrnuje půdní bezobratlé *E. fetida*, sladkovodního a slanovodního koryše *D. magna* a *A. salina* a terestrické rostliny *S. alba*, *A. cepa* a *L. sativa*. Vzorky byly testovány jak kontaktně, tak i v akvatickém uspořádání prostřednictvím vodného výluhu.

Výsledky kontaktních testů byly významně ovlivněny především procentuálním zastoupením testovaného biouhlu ve standardní půdě. Nižší koncentrace byly zvoleny na základě množství předpokládaného při využití biouhlu z čistírenských kalů v zemědělství, ty vyšší měly posoudit jeho vlastnosti jakožto odpadu.

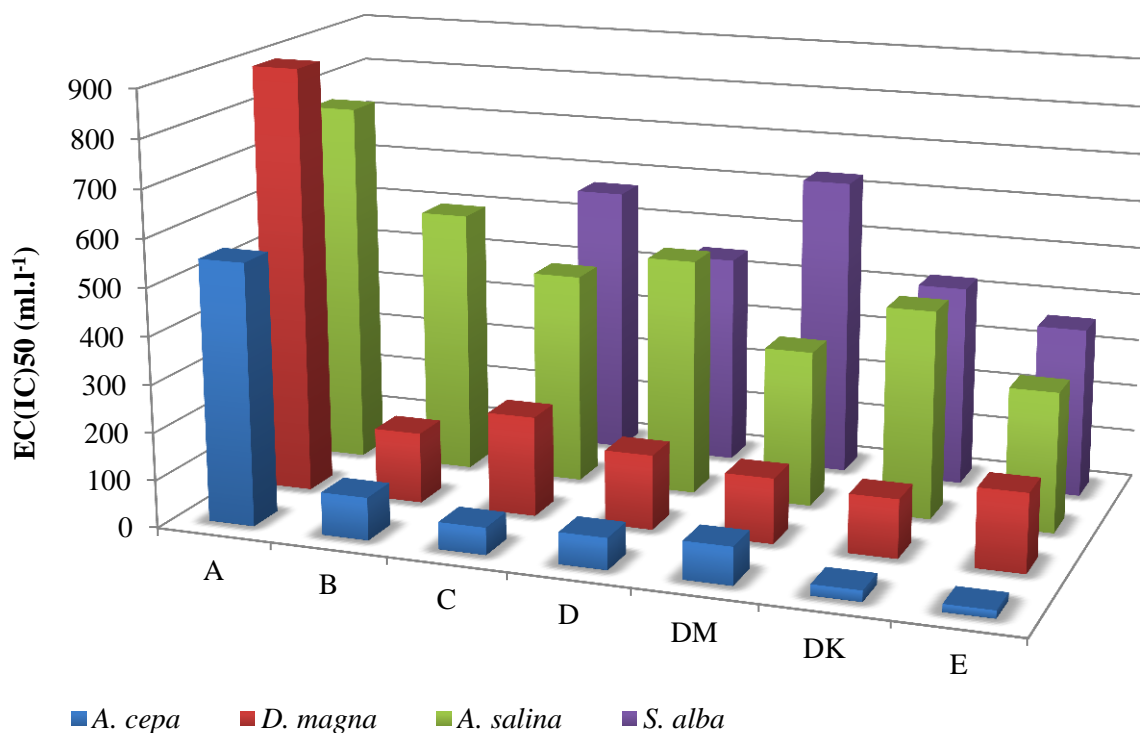
Při porovnání výsledků obou testů s organismem *E. fetida* bylo pozorováno, že vliv některých matric, ve kterých žížaly při 48 hodinovém testu nevykazovaly výrazně únikové chování, se následně v semichronickém testu projevil na jejich celkové mortalitě již v průběhu prvních 28 dní. Dlouhodobá expozice měla pro většinu organismů fatální následky. Matrice, ve kterých byly žížaly schopny nejen inkubační dobu přežít, ale které se ukázaly mít také vhodné podmínky pro jejich rozmnožování, byly pouze vzorky všech biouhlů při nejnížší testované koncentraci, a to 5 g.kg⁻¹, což odpovídá dávce 6 t.ha⁻¹, která je předpokládanou dávkou v případě využití biouhlu na zemědělskou půdu. Sušený kal E se projevil i v nejnížší

testované koncentraci, která odpovídá běžně používané dávce, negativně, protože zde nebyla zaznamenána žádná reprodukce.

Na základě výsledku testu na organismu *L. sativa* by byly všechny vzorky označeny jako ekotoxické z hlediska posuzování nebezpečných vlastností odpadů dle Vyhlášky č. 94/2016 Sb. (53), kde jsou testované vzorky zastoupeny deseti procenty ve standardní půdě. Kdybychom se zaměřili na testované matrice s nižší koncentrací testovaného vzorku, pak by ekotoxicita u všech prokázána nebyla. Co se týče porovnání výsledků vzorku biouhlu D a nepyrolyzovaného kalu E, ze kterého byl tento biouhel vyroben, lze pozorovat snížení ekotoxicity následkem termického zpracování kalu.

Výsledky všech testů v akvatickém uspořádání se lišily v závislosti na citlivosti organismů. Výsledky testů získané na jednotlivých organismech jsou při hodnocení míry toxicity většinou v souladu. Jako nejvíce citlivý z testovaných organismů se projevil *A. cepa*, nejméně *S. alba*. Oba patří mezi základní testovací organismy, proto byla nízká citlivost *S. alba* překvapivá.

Z výsledků všech akvatických testů můžeme označit jako nejméně toxický výluh biouhlu A. Tento výluh se vyznačoval nejnižší konduktivitou, což dokazuje nízký přestup iontů a látek ze vzorku do výluhu. Kal pro výrobu Biouhlu A byl jako jediný z testovaných vzorků obohacen o 30 % přídavkem sena a před pyrolýzou peletizován. Mezi ostatními vzorky biouhlu (B, C a D) nebyly pozorovány větší rozdíly v ekotoxicitě.



Graf 15 - přehled výsledků EC(IC)50 pro jednotlivé organismy

Jako nejvíce toxický se projevil u všech testů kromě testu na organismu *D. magna* výluh nepyrolyzovaného kalu E. Ve srovnání s výluhem biouhlu D docházelo většinou ke snížení toxicity důsledkem pyrolýzy. Kyselý výluh, který měl simulovat podmínky kyselého deště, vykazoval toxicitu většinou o něco vyšší než výluh biouhlu D v granulované formě i mleté (výluh D_M). Výluh připravený z mletého biouhlu D_M byl pro vodní organismy více toxický, naopak pro terestrické rostliny méně. Možným vysvětlením je vyšší míra přestupu iontů, což je opět potvrzeno zvýšenou konduktivitou oproti výluhu z nemletého vzorku. Graf 15 zobrazuje přehled výsledků EC(IC)50 pro jednotlivé organismy.

Dodatečně byl proveden také bakteriální luminiscenční test toxicity na bakteriích *Vibrio Fischeri*. Test potvrdil obdobný trend jako ostatní testy v akvatickém uspořádání a tedy nejméně toxický se jevil výluh biouhlu A. Nejvíce toxickým v tomto případě nebyl výluh sušeného kalu E, ale právě všechny výluhy biouhlu D. Jelikož nebyla prokázána dostatečná citlivost bakterií *V. fischeri*, je nutno brát tyto výsledky pouze jako orientační.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo posouzení ekotoxikologických vlastností biouhlu vyrobeného z čistírenského kalu prostřednictvím vhodných testů ekotoxicity. Pro tyto účely byly k dispozici celkem čtyři vzorky biouhlu a vzorek sušeného čistírenského kalu, který byl původně surovinou pro výrobu jednoho z nich. Vzorky biouhlu se od sebe lišily zejména podmínkami pyrolýzy, v jednom případě v původu suroviny využitě k výrobě a pouze jeden ze vzorků byl před pyrolýzou peletizován za přídavku aditiva.

Ve snaze o objektivní posouzení vlivů biouhlu na ekosystém, byly zvoleny testy kontaktní i akvatické. Na biouhel bylo v rámci této práce nahlíženo jako na půdní přípravek pro zemědělské využití a zároveň jako na odpadní materiál z hlediska posouzení jeho nebezpečných vlastností.

Pro posouzení dlouhodobého přímého účinku byl proveden semichronický test na žížalách *E. fetida*. Bylo stanoveno procentuální zastoupení biouhlu v půdě, při kterém ještě nedocházelo k mortalitě nebo také při kterém docházelo alespoň k nějaké reprodukci, což byla pouze koncentrace 5 g.kg^{-1} , která odpovídá dávce asi 6 t.ha^{-1} . Co se týče testu na rostlině *L. sativa*, na základě Vyhlášky č. 94/2016 Sb. byly všechny testované vzorky označeny jako toxické. Kdybychom ale nahlíželi jen na určité testované koncentrace, ekotoxicita by byla prokázána jen u některých z nich. Na základě výsledků kontaktních testů lze říci, že procentuální zastoupení biouhlu ve standardní půdě mělo větší vliv na všechny sledované endpointy než původ kalu, či podmínky pyrolýzy. V případě využití biouhlu z čistírenských kalů pro zemědělské účely by se potencionální aplikované dávky příliš nelišily od těch, jež jsou v současnosti povoleny pro aplikaci stabilizovaného čistírenského kalu.

Výsledky akvatických testů na vodných výluzích vzorků biouhlu označily výluh biouhlu A jako nejméně ekotoxický. Ten jako jediný ze vzorků byl vyroben s 30% přídavkem sena ve formě pelet, což mělo pravděpodobně pozitivní vliv na jeho ekotoxikologické vlastnosti.

Sušený čistírenský kal se projevil ve většině testů jako nejvíce zátěžový. Při srovnání s biouhlem D, jakožto jeho pyrolytickým produktem, docházelo po termickém ošetření ke snížení ekotoxického účinku, je ale nutno dodat, že tyto rozdíly nebyly nijak markantní.

Řešení problému s nakládáním s čistírenskými kaly je a v příštích několika letech zcela jistě bude velmi aktuální téma. Termická přeměna kalu na biouhel by mohla mít potenciál tento problém alespoň z části vyřešit, ale je nejprve potřeba tento materiál co nejpodrobněji popsat z hlediska jeho ekotoxikologických rizik, dopadu na životní prostředí a následně stanovit bezpečnou dávku, která by měla být vnášena do ekosystému.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. ECO TREND RESEARCH CENTRE S.R.O. *Optimalizace nakládání s kaly z komunálních čistíren odpadních vod*. Praha, 2016.
2. STATISTICKÁ ROČENKA ČESKÉ REPUBLIKY - 2018. ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD [online]. Česká Republika: Český statistický úřad, 2018, 28.11.2018 [cit. 2019-01-20]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/3-zivotni-prostredi-zdsbcjzyh9>.
3. ZÁKON Č. 185/2001 SB. Zákon o odpadech a o změně některých dalších zákonů ve znění pozdějších předpisů.
4. VYHLÁŠKA Č. 437/2016 SB. . *Vyhláška o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady a změně vyhlášky č. 341/2008 Sb.*,
5. HYŽÍK, JAROSLAV. Odpady-online. *Odpady*. [Online] 14. 11 2006. [Citace: 8. 2 2019.] <https://odpady-online.cz/co-s-cistirenskymi-kaly/>.
6. KAREL HARTIG, SOŇA JONÁŠOVÁ. Kaly a cirkulární ekonomika. *Vodní hospodářství*. [Online] <http://vodnihospodarstvi.cz/kaly-a-E2%80%AFcirkularni-ekonomika/>.
7. EUROPEAN COMMISSION. *Towards a circular economy*. [Online] [Citace: 10. 2 2019.] https://ec.europa.eu/commission/priorities/jobs-growth-and-investment/towards-circular-economy_en.
8. RAČEK, J., DOSKOČIL, B., ŠEVČÍK, J., CHORAZY, T., HLAVÍNEK, P. Vodovod.info - vodárenský informační portál. *Sušení čistírenského kalu pro podmínky České republiky*. [Online] 14. 8. 2018. [Citace: 12. 2. 2019.] <http://vodovod.info/index.php/kanalizace-a-cov/388-suseni-cistirenskeho-kalu-pro-podminky-ceske-republiky#.XH2e-IhKjtQ>. 1804-7157.
9. *Sušení kalů na ČOV Karlovy Vary, Drahotice*. FRČEK, ZDENĚK A DRECHSLER, JOSEF. Praha : Sdružení vododů a kanalizací ČR, 2017, Sv. 1. 1210/3039.
10. HARTIG K. *Problematika kalového hospodářství – sušení kalů*, Sweco Hydroprojekt a.s., Tábořská 31, Praha, časopis *Vodní hospodářství* 04/2017.
11. BORIS DOSKOČIL, ING. JAN ŠEVČÍK. TechPark vydavatelství. *Technologická linka pásového sušení kalů*. [Online] [Citace: 10. 02 2019.] <http://www.techpark.sk/technika-782014/technologicka-linka-pasoveho-suseni-kalu.html>.
12. J., LEHMANN. *Terra Preta Nova – Where to from Here?* místo neznámé : Springer, Dordrecht, 2009. 978-1-4020-9030-1.
13. *Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review*. AHMAD, MAHTAB & RAJAPAKSHA, ANUSHKA & LIM, JUNG EUN & ZHANG, MINGWANG & BOLAN, NANTHI & MOHAN, DINESH & VITHANAGE, METHTHIKA & LEE, SANG SOO & OK, YONG SIK. místo neznámé : Chemosphere, 2013, Sv. 99. 10.1016/j.chemosphere. 2013.10.071.
14. HOLUB, P. Biom.cz. *Terra Preta - Tajemství černé země*. [Online] 21. 10 2009. [Citace: 18. 2 2019.] <https://biom.cz/cz/odborne-clanky/terra-preta-tajemstvi-cerne-zeme>. 1801-2655.

15. *Effect of sewage sludge properties on the biochar characteristic.* ANNA ZIELINSKAA, PATRYK OLESZCZUKA, BARBARA CHARMAS, JADWIGA SKUBISZEWSKA-ZIEBAB, SYLWIA PASIECZNA-PATKOWSKA. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [online]., Sv. 112, 201-213 [cit. 2019-03-16]. 0165-2370.
16. *Materiálové a energetické využití suchého stabilizovaného čistírenského kalu – výroba biocharu středně-teplotní pomalou pyrolýzou.* POHOŘELÝ, MICHAEL A KOL. Praha : Ústav chemických procesů AV ČR, 2017.
17. *Physicochemical and agronomic properties of biochar from sewage sludge pyrolysed at different temperatures.* A. MÉNDEZ, M. TERRADILLOS, G. GASCÓ. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2013, Sv. 102. 124–130.
18. *Properties and Beneficial Uses of (Bio)Chars, with Special Attention to Products from Sewage Sludge Pyrolysis.* CALLEGARI, ARIANNA A CAPODAGLIO, ANDREA. místo neznámé : Resources, 2018. 7. 10.3390/resources7010020.
19. *Influence of Pyrolysis Temperature On Production and Nutrient Properties of Wastewater Sludge Biochar.* MUSTAFA K. HOSSAIN, VLADIMIR STREZOV , K. YIN CHAN , ARTUR ZIOLKOWSKI , PETER F. NELSON. místo neznámé : *Journal of Environmental Management*, 2011. 0301-4797.
20. *The influence of organic matter on sewage sludge.* GASCÓ, G., a další, a další. místo neznámé : *Journal of Analytical Applied Pyrolysis*, 2005. 413–420.
21. *Zpracování čistírenských kalů prostřednictvím mikrovlnné pyrolýzy.* JAKUB RAČEK, JAN ŠEVČÍK, TOMÁŠ CHORAZY, PETR HLAVÍNEK, JIŘÍ KUČERÍK. 2018.
22. *Agronomic properties of wastewater sludge biochar and bioavailability of metals in production of cherry tomato .* MUSTAFA K. HOSSAIN, VLADIMIR STREZOV, K. YIN CHAN, PETER F. NELSON. místo neznámé : *Chemosphere*, 2010. 0045-6535.
23. *Application of biochar from sewage sludge to plant cultivation: Influence of pyrolysis temperature and biochar-to-soil ratio on yield and heavy metal accumulation.* X.D. SONG, X.Y. XUE, D.Z. CHEN, P.J. HE, X.H. DAI. místo neznámé : *Chemosphere*, 2014, Sv. 109. 213–220.
24. *Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil.* PAZ-FERREIRO, J., GASCÓ, G., GUTIÉRREZ, B. ET AL. místo neznámé : Springer-Verlag <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0644-3>, 2011. 1432-0789.
25. *Recent advances in utilization of biochar.* QIAN, K., A. KUMAR, H. ZHANG, D. BELLMER a R. HUHNEKE. místo neznámé : Elsevier, 2015, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 1055-1064.
26. *Investigating the potential for energy, fuel, materials and chemicals production from corn residues (cobs and stalks) by non-catalytic and catalytic pyrolysis in two reactor configurations,.* O. IOANNIDOU, A. ZABANIOTOU, E.V. ANTONAKOU, K.M. PAPAZISI, A.A. LAPPAS, C. Athanassiou. místo neznámé : Elsevier, 2009. 1364-0321.
27. *Microwave heating applications in environmental engineering—a review,.* D.A. JONES, T.P. LELYVELD, S.D. MAVROFIDIS, S.W. KINGMAN, N.J. Miles. 2002. 0921-3449.

28. *Microwave pyrolysis of wheat straw: Product distribution and generation mechanism.* XIQIANG ZHAO, WENLONG WANG, HONGZHEN LIU, CHUNYUAN MA, ZHANLONG SONG,. místo neznámé : Bioresource Technology, 2014. 0960-8524.
29. *Biochar from microwave pyrolysis of biomass: A review.* JING LI, JIANJUN DAI, GUANGQING LIU, HEDONG ZHANG, ZUOPENG GAO, JIE FU, YANFENG HE, YAN HUANG. místo neznámé : Biomass and Bioenergy, 2016. 0961-9534.
30. YANING ZHANG, PAUL CHEN, SHIYU LIU, LIANGLIANG FAN, NAN ZHOU, MIN MIN, YANLING CHENG, PENG PENG, ERIK ANDERSON, YUNPU WANG, YIQIN WAN, YUHUAN LIU, et. *Microwave-Assisted Pyrolysis of Biomass for Bio-Oil Production.* [<https://www.intechopen.com/books/pyrolysis/microwave-assisted-pyrolysis-of-biomass-for-bio-oil-production>] místo neznámé : Pyrolysis, Mohamed Samer, IntechOpen, 2017.
31. BENEŠ, BOHUMIL A KOLEKTIV AUTORŮ. Ekotoxicita - H 14. *enviprofi.cz.* [Online] 2019. [Citace: 3. 22 2019.] <https://www.enviprofi.cz/33/ekotoxicita-h-14-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EkRoj-WK0S8teaMC2EY8I2M/>.
32. KOČÍ , VLADIMÍR A MOCO VÁ, KLÁRA. *Ekotoxikologie pro chemiky.* Praha : VŠCHT Praha, 2009. 978-80-7080-699-9.
33. MIERZWA-HERSZTEK, M. , GONDEK, K. , KLIMKOWICZ-PAWLAS, A. , BARAN, A. AND BAJDA, T. *Sewage sludge biochars management—Ecotoxicity, mobility of heavy metals, and soil microbial biomass.* Krakow : Environ Toxicol Chem, Environ Toxicol Chem, 2018. 1552-8618.
34. SIMÓN, MARIANO, A DALŠÍ, *Biochar from Different Carbonaceous Waste Materials: Ecotoxicity and Effectiveness in the Sorption of Metal(loid)s.* [<https://doi-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1007/s11270-018-3860-8>] místo neznámé : Water Air Soil Pollut, 2018. 1573-2932.
35. ZIELINSKA, ANNA A OLESZCZUK, PATRYK. *The conversion of sewage sludge into biochar reduces polycyclic aromatic hydrocarbon content and ecotoxicity but increases trace metal content.* [<https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0961953415000550>] Lublin, Poland : biomass and bioenergy, 2015. 0961-9534.
36. Bezirks Verband Pfalz. *LUFA SPEYER.* [Online] [Citace: 2019. 4 12.] <https://www.lufaspeyer.de/index.php/dienstleistungen/standardboeden/8-dienstleistungen/artikel/57-standard-soils>.
37. GARCIA, M.V.B. *Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions.* University of Bonn, Germany : Ecology and Development, 2004.
38. TEST NO. 207. *Earthworm, Acute Toxicity Tests.* : OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, Section 2 Effects on Biotic Systems, 1984. 9789264070042-en.
39. HOFMAN, JAKUB A VAŠÍČKOVÁ, JANA. *Laboratorní praktikum z půdní ekotoxikologie.* Brno : Centrum pro toxické látky v životním prostředí, Masarykova Univerzita, 2010.

40. TEST NO. 222. *Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/ Eisenia andrei)* . . : OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, Section 2 Effects on Biotic Systems, 2016. 9789264070325-en.
41. ISO 17512-1. *Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour -- Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. Geneva, Switzerland : International Organization for Standardization, 2008.
42. ČSN ISO 11268-2 (836456). *Kvalita půdy - Účinky znečišťujících látek na žížaly - Část 2: Stanovení účinků na reprodukci Eisenia fetida/Eisenia andrei*,. 2016.
43. 11269-1, ČSN EN ISO. *Kvalita půdy - Stanovení účinků znečišťujících látek na půdní flóru - Část 1: Metoda měření inhibice růstu kořene*. 2013.
44. 12457-4, ČSN EN. *Charakterizace odpadů - Vyluhování - Ověřovací zkouška vyluhovatelnosti zrnitých odpadů a kalů - Část 4: Jednostupňová vsádková zkouška při poměru kapalně a pevné fáze 10 l/kg pro materiály se zrnitostí menší než 10 mm*. 2003.
45. MICROBIOTESTS INC. Daphtoxkit F magna. *Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure*. Deinze, Belgium : Creasel, 1995.
46. *Akutní test toxicity na žábronožkách A. salina* . [<https://docplayer.cz/14786824-Akutni-test-toxicity-na-zabronozkach-artemia-salina.html>] místo neznámé : Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT v Praze, Laboratoř ekotoxikologie a LCA .
47. XAVIER. *Toxicity effects of copper and chromium on mortality and growth of Artemia Salina*. [<https://www.flickr.com/photos/xavipat/4451152486>] 2010.
48. MŽP ČR. Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Praha : autor neznámý, 2007.
49. ARCTEROX. [Online] NETGATE Technologies s.r.o. , J. G. . [Citace: 2019. 5 5.] <https://www.arcteryx.sk/korenie/224-biele-horcicne-semena-sinapis-alba-100g-vcelku.html>.
50. FISKESJÖ, G. *The Allium test as standard in environmental monitoring*. [1985] vol. 102. p. 99-112. : autor neznámý.
51. HERATH, H.M.S.K, CAMPS-ARBESTAIN, MARTA A HEDLE, MIKE. *Effect of biochar on soil physical properties in two contrasting soils: An Alfisol and an Andisol*. [online : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706113002164>] místo neznámé : Geoderma, 2013. 0016-7061.
52. ČÍŽEK, Š., KOČÍ, V. A KOCHÁNKOVÁ, L. *Srovnání citlivosti Artemia salina a Daphnia magna v závislosti na celkové mineralizaci prostředí*. [Sborník přednášek: 19 Aktuální otázky vodárenské biologie] Chrudim : autor neznámý, 2003.
53. VYHLÁŠKA Č. 94/2016 SB. *Vyhláška o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů*.
54. DUNNETT, C. W. New tables for multiple comparisons a control. místo neznámé : Biometric, 1964.
55. VINCENT, KIM. *Probit Analysis*. [<http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf>]

SEZNAM POUŽÍVANÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ČOV	Čistírna odpadních vod
ČSN	České technické normy
ČSÚ	Český statistický úřad
EC50	Efektivní koncentrace, při které je pozorován 50% účinek
IC50	Inhibiční koncentrace, při které je pozorován 50% účinek
ISO	International Organization of Standardization – Mezinárodní organizace pro normalizaci
KVK	Kvantitativně výměnná kapacita půdy
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
SOP	Standartní operační postup

PŘÍLOHY

Příloha 1 – Souhrn výsledků semichronického testu *E. fetida*

Příloha 2 – Přehled výsledků testu *A. cepa*

Příloha 3 – Příklad výpočtu Dunnettova testu

Příloha 4 – Dunnettova tabulka

Příloha 5 – Probitová tabulka

PŘÍLOHA 1 – SOUHRN VÝSLEDKŮ SEMICHRONICKÉHO TESTU *E. FETIDA*

Vzorek Biocharu	c (g.kg ⁻¹)	N 28	N 56	M28 (%)	M56 (%)	hmotnostní úbytek žížaly po 28 dnech	hmotnostní úbytek žížaly po 56 dnech	I 28 (%)	I 56 (%)	V	J	V/N	J/N	J/V
A	5	5	5	0	0	-0,003	-0,023	0,7	5,1	12	23	2,4	4,6	1,9
	10	5	4	0	20	0,013	-0,083	-2,9	19,2	11	3,3	2,2	0,7	0,3
	25	5	4,7	0	6,7	0,013	-0,171	-2,8	36,8	6	0	1,2	0	0
	50	5	4,7	0	6,7	-0,051	-0,188	11,2	41,3	3,7	0	0,7	0	0
	100	0	0	100	100	-0,432	-0,432	100	100	-	-	-	-	-
B	5	5	4,7	0	6,7	0,046	-0,125	-9,8	26,7	19	22	3,8	4,4	1,2
	10	5	5	0	0	0,039	-0,074	-9,1	17,1	11	0	2,2	0	0
	25	0	0	100	100	-0,418	-0,418	100	100	-	-	-	-	-
	50	0	0	100	100	-0,414	-0,414	100	100	-	-	-	-	-
	100	0	0	100	100	-0,457	-0,457	100	100	-	-	-	-	-
C	5	5	5	0	0	0,000	0,001	0,0	-0,2	19,7	19	3,9	3,8	1,0
	10	5	3,7	0	26,7	0,000	-0,071	0,0	16,4	6,7	0	1,3	0	0
	25	0	0	100	100	-0,430	-0,430	100	100	-	-	-	-	-
	50	0	0	100	100	-0,425	-0,425	100	100	-	-	-	-	-
	100	0	0	100	100	-0,469	-0,469	100	100	-	-	-	-	-
D	5	5	5	0	0	0,001	-0,058	-0,4	15,6	10	6,7	2	1,3	0,7
	10	5	4,7	0	6,7	0,015	-0,096	-3,2	20,3	14	0	2,8	0	0
	25	0,7	0	86,7	100	-0,072	-0,420	17,1	100	-	-	-	-	-
	50	0	0	100	100	-0,475	-0,475	100	100	-	-	-	-	-
	100	0	0	100	100	-0,487	-0,487	100	100	-	-	-	-	-
E	5	5	5	0	0	-0,007	-0,067	1,5	14,0	16	0	3,2	0	0
	10	4,7	4,3	6,7	13,3	-0,044	-0,194	7,2	31,8	2,7	0	0,6	0	0
	25	0	0	100	100	-0,428	-0,428	100	100	-	-	-	-	-
	50	0	0	100	100	-0,462	-0,462	100	100	-	-	-	-	-
	100	0	0	100	100	-0,454	-0,454	100	100	-	-	-	-	-
Kontrola	0	5	5					13,7	29,4	10	9,3	2	1,9	0,9

N – počet žížal; M – mortalita (%); I – inhibice hmotnosti; V – počet kokonů; J – počet juvenilů

PŘÍLOHA 2 – PŘEHLED VÝSLEDKŮ TESTU A. CEPA

c (ml/l)		0	62,5	125	250	500	1000	IC 50
A	\bar{L} (mm)	62	65,2	60,8	54,4	34,8	14,4	549
	I_l (%)	-	-5,2	1,9	12,3	43,9	76,8	
B	\bar{L} (mm)	64,2	32,6	33,2	20,8	13,6	5,2	90
	I_l (%)	-	49,2	48,3	67,6	78,8	91,9	
C	\bar{L} (mm)	64,2	38	15,6	12,2	4,2	2,4	57
	I_l (%)	-	40,8	75,7	81,0	93,5	96,3	
D	\bar{L} (mm)	59,4	37	17,2	8,8	4,8	2,2	66
	I_l (%)	-	37,7	71,0	85,2	91,9	96,3	
D _M	\bar{L} (mm)	59,4	36,4	24,6	7,6	3,8	2,4	79
	I_l (%)	-	38,7	58,6	87,2	93,6	96,0	
D _K	\bar{L} (mm)	59,4	21,8	17,2	12	3,4	1,8	23
	I_l (%)	-	63,3	71,0	79,8	94,3	97,0	
E	\bar{L} (mm)	62	12	5,4	3	2	0	16
	I_l (%)	-	80,6	91,3	95,2	96,8	100,0	
c (ml/l)		0	62,5	125	250	500	1000	IC 50
A	\bar{m} (g)	1,887	1,676	1,607	1,580	0,910	0,504	509
	I_m (%)		11,2	14,8	16,3	51,8	73,3	
B	\bar{m} (g)	1,599	1,138	1,043	0,466	0,414	0,151	165
	I_m (%)		28,8	34,8	70,9	74,1	90,6	
C	\bar{m} (g)	1,599	1,017	0,435	0,418	0,145	0,125	72
	I_m (%)		36,4	72,8	73,9	90,9	92,2	
D	\bar{m} (g)	1,485	0,997	0,573	0,383	0,245	0,141	98
	I_m (%)		32,9	61,4	74,2	83,5	90,5	
D _M	\bar{m} (g)	1,485	1,003	0,885	0,518	0,292	0,102	147
	I_m (%)		32,5	40,4	65,1	80,3	93,1	
D _K	\bar{m} (g)	1,485	0,643	0,601	0,586	0,212	0,093	58
	I_m (%)		56,7	59,5	60,5	85,7	93,7	
E	\bar{m} (g)	1,887	0,519	0,261	0,193	0,108	0,000	20
	I_m (%)		72,5	86,2	89,8	94,3	100,0	

PŘÍLOHA 3 – PŘÍKLAD VÝPOČTU PODLE DUNNETTOVA TESTU

Příklad výpočtu pro test inhibice růstu kořene *L. sativa*

Výpočet počtu stupňů volnosti v :

$$v = n \cdot (N - 1) = 4 \cdot (15 - 1) = 56$$

kde n je počet stanovení pro každou testovanou látku a N je celkový počet rostlin do ní nasazených.

Počet stupňů volnosti byl použit pro výpočet směrodatné odchylky S :

$$S = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n \cdot \sum x_j^2}{v}} = \sqrt{\frac{7968 - 7070}{56}} = 4,004$$

Kde $\sum x_i^2$ je součet druhých mocnin délek kořínků a $\sum x_j^2$ je součet druhých mocnin průměrných délek kořínků

Ze směrodatné odchylky byla následně vypočtena standardní chyba SE :

$$SE = S \cdot \sqrt{\frac{n - 1}{N}} = 4,004 \cdot \sqrt{\frac{4 - 1}{15}} = 1,791$$

Na základě výsledku standardní chyby byl stanoven významný rozdíl SD (Significant difference):

$$SD = t \cdot SE = 2,41 \cdot 1,791 = 4,31$$

kde SD je významný rozdíl (mm), t je tabelovaná hodnota určovaná Dunnettovou tabulkou (viz Příloha 4)

Tato hodnota je následně porovnávána s průměrnou hodnou v kontrole a daném stanovení.

PŘÍLOHA 4 – DUNNETTOVA TABULKA (54)

Multiple Comparisons Against a Benchmark
with No Prior Hypotheses on Direction
(Dunnett's t at 5% level for two-tail comparisons
between several treatments and a control)

Degrees of Freedom	Number of Treatment Means (Excluding the Control)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	2.57	3.03	3.29	3.48	3.62	3.73	3.82	3.90	3.97
6	2.45	2.86	3.10	3.26	3.39	3.49	2.57	3.64	3.71
7	2.36	2.75	2.97	3.12	3.24	3.33	3.41	3.47	3.53
8	2.31	2.67	2.88	3.02	3.13	3.22	3.29	3.35	3.41
9	2.26	2.61	2.81	2.95	3.05	3.14	3.20	3.26	3.32
10	2.23	2.57	2.76	2.89	2.99	3.07	3.14	3.19	3.24
11	2.20	2.53	2.72	2.84	2.94	3.02	3.08	3.14	3.19
12	2.18	2.50	2.68	2.81	2.90	2.98	3.04	3.09	3.14
13	2.16	2.48	2.65	2.78	2.87	2.94	3.00	3.06	3.10
14	2.14	2.46	2.63	2.75	2.84	2.91	2.97	3.02	3.07
15	2.13	2.44	2.61	2.73	2.82	2.89	2.95	3.00	3.04
16	2.12	2.42	2.59	2.71	2.80	2.87	2.92	2.97	3.02
17	2.11	2.41	2.58	2.69	2.78	2.85	2.90	2.95	3.00
18	2.10	2.40	2.56	2.68	2.76	2.83	2.89	2.94	2.98
19	2.09	2.39	2.55	2.66	2.75	2.81	2.87	2.92	2.96
20	2.09	2.38	2.54	2.65	2.73	2.80	2.86	2.90	2.95
24	2.06	2.35	2.51	2.61	2.70	2.76	2.81	2.86	2.90
30	2.04	2.32	2.47	2.58	2.66	2.72	2.77	2.82	2.86
40	2.02	2.29	2.44	2.54	2.62	2.68	2.73	2.77	2.81
60	2.00	2.27	2.41	2.51	2.58	2.64	2.69	2.73	2.77
120	1.98	2.24	2.38	2.47	2.55	2.60	2.65	2.69	2.73
x	1.96	2.21	2.35	2.44	2.51	2.57	2.61	2.65	2.69

PŘÍLOHA 5 – PROBITOVÁ TABULKA (55)

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09